



Editorial de la Universidad
Tecnológica Nacional

**Seminario de Procesos Fundamentales
Físico-Químicos y Microbiológicos
Especialización y Maestría en Medio Ambiente
Laboratorio de Química
F.R. Bahía Blanca – U.T.N.
2009**

**Microbiología de las aguas residuales - Aplicación de
Biosólidos en Suelo**

*Lic. Gustavo Fernando Merli,
Ing. Nestor Omar Ricciuti*

**Evaluación de la calidad del agua de los recursos hídricos
superficiales de la cuenca del arroyo Chasicó; Sudoeste
bonaerense**

Lic. Noelia Torres

**Celdas de Combustible
Ventajas de una generación de electricidad limpia y
eficiente vía electroquímica**

Ing. Carlos A. Pistones

**Los efectos de los Campos Electromagnéticos en la salud
*Roberto D'Elmar, Gabriel Mujica, José Luis Haure***



**Microbiología de la leche
*Ing. Mauricio Celis y Lic. Daniel Juárez***

**Síndrome del edificio enfermo
*Ing. Ma. Cecilia Montero***

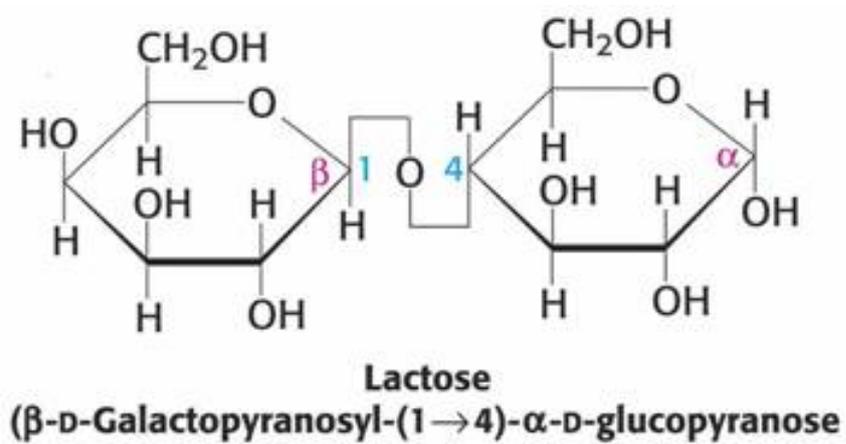
Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional – edUTecNe

<http://www.edutecne.utn.edu.ar>

edutecne@utn.edu.ar



“PROCESOS FUNDAMENTALES FISICOQUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS”



Dr. Roberto RODRIGUEZ
Bioq. Milena ECHEVARRIA

SEMINARIO 2009



INDICE	
CONTENIDO	Página
1. OBJETIVO	3
2. INTRODUCCION	3
3. DESARROLLO	4
3.1 PROPIEDADES Y CARACTERISTICAS DE LA LECHE	4
3.2 COMPONENTES DE LA LECHE	6
3.3 FUENTES DE CONTAMINACION DE LA LECHE	12
3.4 MICROORGANISMOS DE LA LECHE	13
3.5 ACCION DE LOS MICROORGANISMOS EN LA LECHE	16
3.6 INDICADORES DE CALIDAD DE LA LECHE	17
3.7 FACTORES QUE AFECTAN EL DESARROLLO DE LOS MICROORGANISMOS	18
3.8 DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES EN LA LECHE Y SUS PRODUCTOS	20
3.9 PATEURIZACION	23
4. CONCLUSIONES	25



1. OBJETIVO

Estudiar los efectos de los microorganismos sobre la calidad de la leche vacuna para el consumo humano.

2. INTRODUCCION

La leche es una suspensión coloidal heterogénea que comprende partículas de grasa, caseína, lactosa, trazas de calcio, fósforo y compuestos de potasio, lactalbuminas y algunas vitaminas. La grasa de la crema se presenta en partículas de varios tamaños visibles en microscopios ópticos. Están cubiertas por una superficie de capa de proteínas que actúan como coloides protector. La caseína es de dimensiones coloidales y se coagula cuando la lactosa se convierte en ácido láctico por calor o bacterias.

La lactosa y otros compuestos están en verdadera solución molecular. El material restante es agua. Así la leche es una solución compleja que presenta todos los grados de dispersión de molecular a microscópico. La leche humana contiene solamente una tercera parte de la proteína de la leche de vaca y un porcentaje de lactosa mucho más altos, para acomodarse al aparato digestivo del niño.

Por su aporte nutricional la leche es uno de los alimentos de mayor importancia en muchos países del mundo. No obstante, este alimento, cuando no es manejado de manera adecuada, es un excelente vehículo para la transmisión de enfermedades al hombre, tanto las de carácter zoonótico como las ocasionadas por patógenos que se producen por la contaminación de los productos durante los procesos de obtención y transformación de la leche.

Las condiciones de higiene y sanidad en las explotaciones lecheras tienen un efecto importante en la calidad microbiológica de la leche, cuanto mayores sean los cuidados aplicados a la obtención higiénica de la leche y a la sanidad de los animales productores de leche, menores serán los contenidos microbianos en la misma. Asimismo, corrales libres de estiércol y lodo, salas de ordeño limpias, equipo de ordeño funcionando de manera adecuada y una rutina de ordeño correcta, resultarán en una baja incidencia de mastitis, lo cual se manifestará con bajos recuentos de células somáticas.

Es importante resaltar que la presencia de células somáticas (CS) en la leche cruda es el principal indicador de la salud de la ubre de la vaca, el valor normal en un animal sano oscila alrededor de 200 000 CS/ml y conteos superiores a 400 000 CS/ml indican problemas de mastitis en las vacas. El impacto de estas cuentas elevadas es significativo tanto en el volumen de producción de leche, como en la calidad de la misma, afectando económicamente tanto al sector productivo como al industrial. Al primero por la reducción de litros de leche / vaca/ día, al segundo, por la disminución de la calidad y cantidad de las proteínas contenidas en la leche, así como la vida en anaquel de los productos elaborados a partir de ella.

La leche contiene pocas bacterias al extraerla de la ubre de una vaca sana, sin embargo, durante el ordeño, la leche se puede contaminar a partir del animal, especialmente de las zonas externas de la ubre y áreas próximas; del medio ambiente, desde el estiércol y el suelo, así como del lecho en el que descansan los animales, y a través del polvo, aire, agua e insectos (particularmente moscas). Probablemente las dos fuentes de contaminación más significativas sean el equipo y utensilios, utilizados para su obtención y recolección, así como las superficies que entran en contacto con la leche, incluidas las manos de los ordeñadores y demás personal.

El número de microorganismos presentes en la leche varía de cuarto a cuarto y de vaca a vaca, dependiendo de los sistemas de limpieza y desinfección utilizados; cuando es obtenida en condiciones asépticas, oscila entre 100 y 1000 UFC/ml. En la práctica, la leche recién obtenida contiene de 1000 a 10000 UFC/mL, constituidos por contaminantes procedentes del entorno de la ubre, el equipo de ordeño y los manipuladores.

Durante su transporte y almacenamiento, así como durante la elaboración de los productos, las fuentes de contaminación son las superficies que contactan con los mismos: botes lecheros, pipas, tanques de almacenamiento, bombas, tuberías, filtros, agitadores, envasadoras, transportadores, tinas, utensilios, etc.



La leche, por su composición, es muy susceptible de sufrir alteraciones debidas al crecimiento microbiano en la misma, particularmente cuando la temperatura de conservación no es la adecuada. Por ello, es importante señalar los cambios que se registran en la calidad microbiológica de la leche cruda cuando es sometida a diferentes formas de manejo.

La calidad microbiológica de la leche cruda cambia significativamente durante su manejo y transporte, particularmente cuando no se cuenta con los medios para su enfriamiento inmediato una vez obtenida. Estos cambios ponen en riesgo el cumplimiento del requisito de calidad para ser considerada como leche apta para consumo humano. Al haber más cantidad de bacterias mesofílicas, puede existir un mayor riesgo de contaminación de la leche por patógenos, así como el crecimiento de los mismos en los productos terminados.

El desarrollo microbiano en la leche ocasiona una serie de modificaciones químicas que pueden dar lugar a procesos alterativos y a procesos útiles. Muchos de sus componentes pueden degradarse, pero las alteraciones más acusadas resultan de la degradación de los tres componentes fundamentales: lactosa, proteínas y grasa.

La lactosa, azúcar de la leche, es la principal fuente de energía de las bacterias y puede experimentar diferentes fermentaciones. Cualesquiera que sean las bacterias que fermentan la lactosa, siempre habrá producción de ácidos orgánicos, con la coagulación o no de las proteínas de la leche (dependiendo del nivel de acidificación) y la formación o no de gas. Por otra parte, algunas bacterias que actúan sobre el azúcar de la leche, pueden formar sustancias viscosas.

Las proteínas, en general, se descomponen tras la coagulación de la leche, dando lugar a sabores y olores desagradables. La materia grasa es hidrolizada por las lipasas microbianas, reacción lenta, que influye rápidamente sobre el sabor de la leche.

Los tipos de deterioro que suelen observarse en la leche cruda incluyen: la fermentación, coagulación, proteólisis, mucosidad, coloraciones diversas, y producción de aromas y sabores anormales.

3. DESARROLLO

3.1 PROPIEDADES Y CARACTERISTICAS DE LA LECHE

3.1.1 CARACTERÍSTICAS ORGANOLEPTICAS

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.

3.1.2 PROPIEDADES FÍSICAS DE LA LECHE

Densidad:

La densidad de la leche puede fluctuar entre 1.028 a 1.034 g/cm³ a una temperatura de 15°C; su variación con la temperatura es 0.0002 g/cm³ por cada grado de temperatura.

La densidad de la leche varía entre los valores dados según sea la composición de la leche, pues depende de la combinación de densidades de sus componentes, que son los siguientes:

- **Agua:** 1.000 g/cm³.
- **Grasa:** 0.931 g/cm³.
- **Proteínas:** 1.346 g/cm³.
- **Lactosa:** 1.666 g/cm³.
- **Minerales:** 5.500 g/cm³.

La densidad mencionada (entre 1.028 y 1.034 g/cm³) es para una leche entera, pues la leche descremada esta por encima de esos valores (alrededor de 1.036 g/cm³), mientras que una leche aguada tendrá valores menores de 1.028 g/cm³.

pH de la leche:

La leche es de característica cercana a la neutra. Su pH puede variar entre 6.5 y 6.65.

Valores distintos de pH se producen por deficiente estado sanitario de la glándula mamaria, por la cantidad de CO₂ disuelto; por el desarrollo de microorganismos, que desdoblan o convierten la lactosa en ácido láctico; o por la acción de microorganismos alcalinizantes.

Acidez de la leche:

Una leche fresca posee una acidez de 0.15 a 0.16%. Esta acidez se debe en un 40% a la anfoterica, otro 40% al aporte de la acidez de las sustancias minerales, CO₂ disuelto y ácidos orgánicos; el 20% restante se debe a las reacciones secundarias de los fosfatos presentes.

Una acidez menor al 0.15% puede ser debido a la mastitis, al aguado de la leche o bien por la alteración provocada con algún producto alcalinizante.

Una acidez superior al 0.16% es producida por la acción de contaminantes microbiológicos. (La acidez de la leche puede determinarse por titulación con N_a OH 10N o 9N).



Viscosidad:

La leche natural, fresca, es más viscosa que el agua, tiene valores entre 1.7 a 2.2 centi poise para la leche entera, mientras que una leche descremada tiene una viscosidad de alrededor de 1.2 cp.

La viscosidad disminuye con el aumento de la temperatura hasta alrededor de los 70°C, por encima de esta temperatura aumenta su valor.

Punto de congelación:

El valor promedio es de -0.54°C (varia entre -0.513 y -0.565°C). Como se aprecia es menor a la del agua, y es consecuencia de la presencia de las sales minerales y de la lactosa.

Punto de ebullición:

La temperatura de ebullición es de 100.17°C.

Calor específico:

La leche completa tiene un valor de 0.93 - 0.94 cal/g°C, la leche descremada 0.94 a 0.96 cal/g°C.

3.1.3 PROPIEDADES QUÍMICAS - COMPOSICIÓN

La leche es un líquido de composición compleja, se puede aceptar que está formada aproximadamente por un 87.5% de sólidos o materia seca total.

El agua es el soporte de los componentes sólidos de la leche y se encuentra presente en dos estados: como agua libre que es la mayor parte (intersticial) y como agua adsorbida en la superficie de los componentes.

En lo que se refiere a los sólidos o materia seca la composición porcentual más comúnmente hallada es la siguiente:

- **Materia grasa** (lípidos): 3.5% a 4.0%
- **Lactosa:** 4.7% (aprox.)
- **Sust. nitrogenadas:** 3.5% (proteínas entre ellos)
- **Minerales:** 0.8%

A pesar de estos porcentajes en la composición de la leche se acepta como los más comunes, no es fácil precisar con certeza los mismos, pues dependen de una serie de factores, aún para una misma vaca. (No solo varía la composición, sino también la producción).

Esto hace que no todas las leches sean iguales en sus propiedades y la variación en la composición hace que determinadas leches sean útiles para la elaboración de un cierto derivado lácteo, pero a su vez es inapropiada para otros. De la misma manera, se tendrá algunas leches más nutritivas que otras.

3.2 COMPONENTES DE LA LECHE

3.2.1 Grasas

Debido a diversos factores que intervienen en la composición de la leche (algunos de los cuales se han mencionado anteriormente) el contenido de grasa en la leche vacuna varía notablemente; los valores porcentuales más comunes se encuentran entre 3.2 y 4.2%.

La materia grasa está constituida por tres tipos de lípidos:

- a) Las sustancias grasas propiamente dichas es decir los triglicéridos y que forman el 96% del total de la materia grasa.
- b) Los fosfolípidos, que representan entre el 0.8 y el 1%.

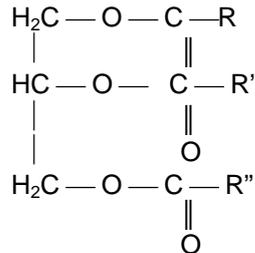


- c) Sustancias no saponificables que constituyen otro 1%.

El resto lo constituyen digliceridos, monogliceridos, ácidos grasos libres, etc.

a) Grasas propiamente dichas:

Los triglicéridos son los componentes naturales de todas las grasas y aceites. Son ésteres formados por un triol (la glicerina) y distintos ácidos grasos:



R, R', R'' son radicales generalmente distintos.

En el caso de la leche, la grasa tiene una serie de características importantes:

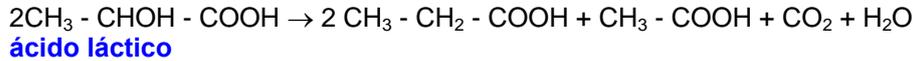
- 1) Tienen una gran variedad de ácidos grasos; se han logrado identificar 150, aunque los más importantes son muchos menos: 13 y son los siguientes (a su vez se indican su porcentaje en la grasa y la temperatura de fusión):

Ácido graso	Porcentaje	Punto fusión (°C)
Butírico (4 carbonos)	3.5%	-7°C
Caproico (6 carbonos)	2%	-4°C
Caprílico (8 carbonos)	1%	16°C
Cáprico (10 carbonos)	2%	31.3°C
Láurico (12 carbonos)	2.5%	43.6°C
Mirístico (14 carbonos)	10%	54°C
Palmitico (16 carbonos)	27%	62°C
Estearico (18 carbonos)	10.5%	70°C
Araquídico (20 carbonos)	0.5%	77°C
Oleico (18 carbonos)	33%	13°C
Vacénico (18 carbonos)	33%	39°C
Linolenico (18 carbonos)	4%	-----
Linioleico (18 carbonos)	4%	-----

- 2) Los últimos cuatro son ácidos grasos no saturados y los restantes son saturados; estos últimos constituyen la mayor parte de la grasa, alrededor del 60% mientras que los no saturados (son los que presentan una, dos o tres dobles ligaduras entre carbonos) son el 35% aproximadamente.
- 3) Las grasas tienen una gran proporción de ácidos grasos volátiles de bajo peso molecular y, en especial, de ácido butírico (las demás leches de mamíferos no contienen tanto ácido butírico salvo la de oveja).
- 4) La presencia de ácidos grasos volátiles (a pesar que cuantitativamente son porcentajes pequeños) influyen mucho en el punto de fusión de los grasos, pues son líquidos, a diferencia de los otros ácidos grasos saturados que son sólidos. Es una característica el fuerte olor de estos ácidos volátiles y que son indicativos de la rancidez hidrolítica.
- 5) Los ácidos caprílicos y capricos están presentes en la leche de vaca en un porcentaje mucho menos que en la de otros mamíferos, por ejemplo, cabra y oveja y es útil para detectar adulteraciones de la grasa de leche con grasas de leche de cabra u oveja.



Dando también algunos compuestos aromáticos tales como el acetyl - methyl carbinol y diacetyl. El ácido láctico puede a su vez transformarse por acción bacteriana (*Propionibacterium shermani*) en ácido propiónico, ácido acético y CO₂ como ocurre en los quesos Gruyere).



El ácido láctico puede también ser transformado a ácido butírico por bacterias anaerobias.

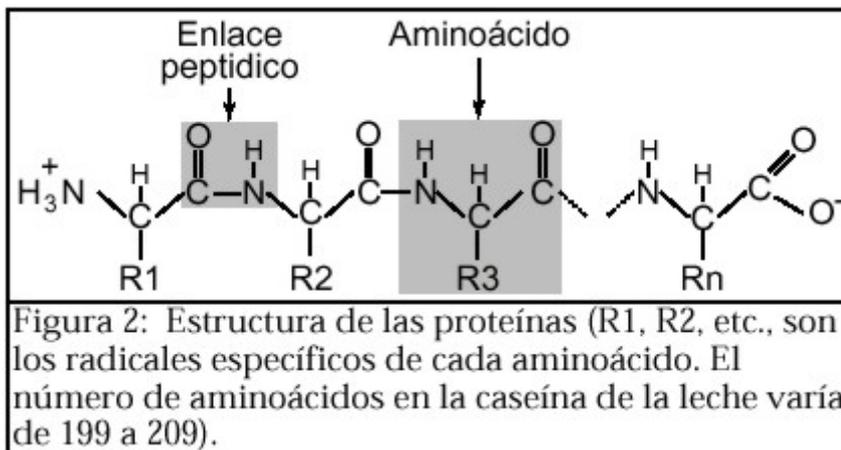
La lactosa es el factor limitante en la producción de leche, o sea que la cantidad de leche que se produce dependerá de la formación de lactosa. Se distingue de los demás azúcares por su estabilidad en el tracto digestivo del hombre y es la única fuente de galactosa para el hombre.

3.2.3 Sustancias Nitrogenadas de la leche

Las sustancias nitrogenadas constituyen la parte más compleja de la leche. Dentro de estas sustancias están las proteínas (las más importantes) y sustancias no proteicas.

La mayor parte del nitrógeno de la leche se encuentra en la forma de proteína (Figura 2). Los bloques que construyen a todas las proteínas son los aminoácidos. Existen 20 aminoácidos que se encuentran comúnmente en las proteínas. El orden de los aminoácidos en una proteína, se determina por el código genético, y le otorga a la proteína una conformación única. Posteriormente, la conformación espacial de la proteína le otorga su función específica.

La concentración de proteína en la leche varía de 3.0 a 4.0% (30-40 gramos por litro). El porcentaje varía con la raza de la vaca y en relación con la cantidad de grasa en la leche. Existe una estrecha relación entre la cantidad de grasa y la cantidad de proteína en la leche. Cuanto mayor es la cantidad de grasa, mayor es la cantidad de proteína.



Las sustancias proteicas de la leche pueden clasificarse en dos grupos:

a) **Holoprotidos:**

Son llamadas las proteínas solubles de la leche y se hallan en el lactosuero, producido cuando se coagulan las proteínas y constituyen el 17% del total de proteínas de la leche. Los principales holoprotidos presentes en la leche son: lactoalbuminos, lactoglobulina, inmuno globulina y seroalbumina. Tienen un gran valor nutritivo.

b) **Heteroprotidos:**

El principal heteroprotido de la leche es la caseína; comprende un complejo de proteínas fosforadas que coagulan en la leche a un pH de 4.6 (punto isoelectrico) o cuando se hallan bajo la acción de enzimas



específicas como el cuajo, se los llama proteínas insolubles, constituyen el 78% del total de las proteínas de la leche. Aunque genéricamente se llama caseína, en realidad existen varias caseínas: la α -caseína, la β -caseína, la ϕ -caseína y la caseína D.

Estas caseínas están compuestas por cadenas heterogéneas de 20 aminoácidos; estos aminoácidos son los siguientes: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, cisteína, cistina, metionina, ácido glutámico, ácido aspártico, lisina, arginina, histidina, fenilalanina, tirosina, triptofano, prolina, hidroxiprolina.

El contenido de caseína en la leche es del 2,7% aproximadamente (el contenido de sustancias nitrogenadas en la leche es del 3.7%).

La caseína (y todas las sustancias nitrogenadas) se hallan en la leche en forma de micelas, dispersas en suspensión coloidal. Las caseínas como ya se dijo, forman una estructura compleja: las caseínas α , β y ϕ se asocian y forman polímeros o complejos que en presencia de calcio y fosfatos se unen y forman agregados heterogéneos llamadas micelas. El calcio favorece la formación de micelas cuando está presente en pequeñas proporciones como en la leche. Una concentración 10 veces mayor provoca, por el contrario, la disolución del complejo calcio-caseína y la floculación de las caseínas sensibles al calcio.

La modificación del pH de la leche, ya sea por adición de ácidos o fermentación láctica provoca la destrucción de los micelos y neutraliza su carga eléctrica, teniendo como consecuencia que los micelos se aglomeren entre sí y precipiten; esto puede acelerarse con un agente deshidratante como alcohol o calor. Esa precipitación se produce como ya se mencionó a un pH de 4.6, mientras mayor sea la temperatura, la floculación de la caseína se produce a pH más elevado.

Las caseínas pueden ser precipitadas también por la acción enzimática, en particular la quimosina o renina; en este caso la enzima transforma el caseinato de calcio a para caseinato de calcio que es soluble, pero que en presencia de iones calcio, estos se van fijando al procaseinato, se insolubiliza y forma un gel. A diferencia de la caseína precipitada por electrolitos (ácido), la caseína precipitada por electrolito (ácido), la precipitación con enzimas es irreversible.

Otra forma de coagular la caseína es con calor, pero a temperaturas superiores a 130°C y mantenidas en un cierto tiempo.

3.2.4 Enzimas

La leche contiene varias enzimas. Algunas se hallan en las membranas de los glóbulos de grasa, por lo que son arrastradas cuando se separa la crema; entre ellos están los reductosos aldehídicos, fosfatosos, etc.

Otras enzimas flocculan con la caseína a pH 4.6, por ejemplo los proteasos, catalasos, etc. Muchas veces es difícil saber el origen de las enzimas, ya que las bacterias que pueden hallarse semejantes a los que se sintetizan en las glándulas mamarias.

La actividad enzimática de la leche depende del pH y de la temperatura. La elevación de la temperatura a más de 70°C provoca su destrucción.

Las principales enzimas presentes en la leche son las siguientes: la lactoperoxidasa, reductasaldolasa (asociada a la membrana del glóbulo de grasa), catalasa, lipasas (responsables de la rancidez de la leche), fosfatasa (en la membrana del glóbulo de grasa), proteasas (asociadas a la caseína) amilasas (hay enzimas desnitrificantes y enzimas sacarificantes, α y β amilasas respectivamente), lisozima (es importante desde el punto de vista de la nutrición ya que facilita la precipitación de la caseína en forma de floculo lo que mejora su digestibilidad; por otra parte posee propiedades bacteriostáticas).

3.2.5 Minerales y Ácidos orgánicos

En la leche vacuna la cantidad de minerales varía en alrededor de 0.8%.

Es rica en potasio, siendo importante también la presencia de fósforo, calcio y magnesio; el contenido de minerales es bastante superior al existente en la leche humana.



En cuanto a los ácidos orgánicos, la presencia más importante es la del ácido cítrico que interviene en el equilibrio de calcio en las micelas de caseína, contiene además, pero en muy pequeñas cantidades ácido fórmico, acético y láctico.

3.2.6 Vitaminas

La leche es el alimento que contiene la variedad más completa de vitaminas, sin embargo, estos se hallan en pequeñas cantidades y algunos no alcanzan para los requerimientos diarios. Las vitaminas se clasifican en dos grupos según sean solubles en lípidos o en agua:

a) Vitaminas liposolubles:

Son las vitaminas A (100 a 500 mg/litro); vitamina D (2 mg/litro); vitamina E (500 a 1000 mg/litro); vitamina K (solo hay trazos). Estas vitaminas son resistentes al calor, se hallan en la materia grasa y son menos abundantes (solo la D), que en la leche humana.

b) Vitaminas hidrosolubles:

Se hallan en la fase acuosa y son: vitamina B₁ (tiamina o aneurina) y vitamina B₂ (riboflavina o lactoflovina): estas dos son las más abundantes: 400 a 1000 mg/litro de la B₁ y 800 a 3000 mg/litro de B₂; vitamina B₁₂ (cianocobalamina) esta presente en muy pequeñas cantidades; vitaminas PP ácido nicotínico): 5 a 10 mg/litro; vitamina C (ácido ascorbico): ácido ascorbico): 10 a 20 mg/litro.

De las vitaminas hidrosolubles la leche vacuna tiene más vitaminas del complejo B que la leche humana; algunos son muy resistentes a las temperaturas altas (como la B₁) mientras que otros se destruyen fácilmente con el calor (como la C).

3.3 FUENTES DE CONTAMINACION DE LA LECHE

La calidad de la leche puede determinarse por la existencia de diversos tipos de contaminantes. Estos se pueden dividir en dos grupos:

3.3.1 CONTAMINANTES QUÍMICOS

Los que más frecuentemente son posibles de hallar en la leche derivan del medio que rodean a la leche en el camino desde la ordeña a su proceso industrial. Es posible encontrar insecticidas (DDT, aldrin, dieldrin, heptacloruro fenol), herbicidas, fungicidas, sustancias higienizantes (cloro, peróxido de hidrogeno, sustancias amoniacales, etc.) y algunos antibióticos (penicilinas, estreptoncinos, clorotetraciclinos, etc.).

3.3.2 CONTAMINANTES BIOLÓGICOS

Existe la posibilidad de que la leche se encuentre afectada de un gran número de agentes microbianos desde el momento de su producción, dependiendo en gran medida de las prácticas de higiene y sanidad observadas en el manipuleo durante la producción, transporte, proceso y venta.

3.3.2.1 CONTAMINACION INICIAL

La contaminación inicial tiene su origen intrínseco en el estado del animal y su ubre. Esta contaminación puede ser a través de dos vías:

3.3.2.1.1 VIA ASCENDENTE (Microorganismos de origen mamario)

Aunque la leche se obtiene por vacas sanas y en las mejores condiciones asépticas, es raro que sea enteramente estéril, debido a la anatomía de su ubre (conductos gruesos y poco ramificados que facilitan la penetración de microorganismos por vía ascendentes, a diferencia de otras especies como ovejas y cabras, de los cuales si se pueden tener leches estériles). El microorganismo que más frecuentemente es posible hallar en las glándulas mamarias es el streptococcus coryne bacterium, que rara vez supera los 1000 microorganismos por milímetro.

Microorganismos causantes de la mastitis

Estos agentes microbianos se hallan en glándulas mamarias infectadas, pueden nombrarse



Corinebacterium pyogenes, Pseudomonos y Escherichia coli. Entre los estreptococcus, el streptococcus pyrogenes y streptococcus agalactial (que no coagulan la leche); el Streptococcus pyrogenes es patógeno para el hombre pudiendo provocar infecciones en la garganta. Entre los estafilococos, se encuentra el Staphylococcus aureus lácticos, lo cual se traduce en la disminución de la cantidad de leche que produce una vaca.

La propagación de los microorganismos mastíticos pueden deberse a las condiciones de la ordeña, el medio ambiente externo y la edad de la vaca, puesto que cuanto más viejas más proclives son a la infección. Las leches con mastitis producen pérdidas económicas (por la baja producción), cambiar en la composición de la leche y resultan difíciles de coagular y de desuerar. Los microorganismos de la mastitis quedan destruidos durante la pasteurización.

3.3.2.1.2 VIA ENDOGENA

Las glándulas mamarias son posibles de infectarse con microorganismos provenientes de la sangre del animal. Entre estos están el Mycobacterium tuberculosis (variedad hominis y variedad bovis) causantes de tuberculosis en el hombre; también puede hallarse la Brucellosis (Brucella abortus y Brucellis melitensis) causantes de brucelosis en el hombre y provocan abortos en las vacas. El Mycobacterium tuberculosis es muy resistente en medios ácidos y es bastante termoresistente y por eso que el estudio de la pasteurización se hacen basados en la resistencia térmica de este microorganismo.

3.3.2.2 CONTAMINACIÓN EXTERNA:

Los orígenes de la contaminación externa hay que buscarlos en la ordeña, el medio ambiente, la limpieza del animal, limpieza y salud del personal que trabaja, limpieza de maquinas, equipos y utensilios utilizados y en la calidad del agua.

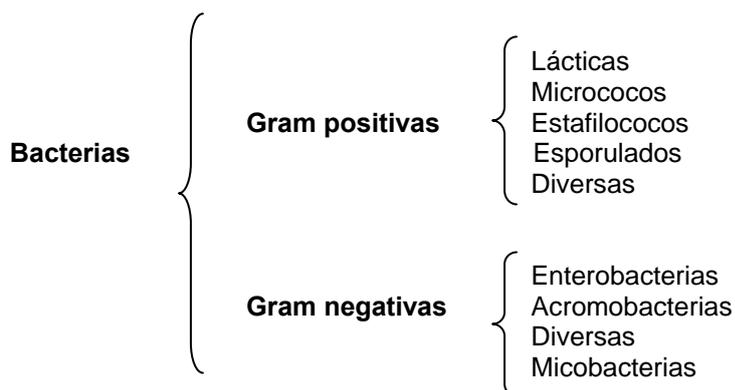
Es así como el aire, por ejemplo, puede transportar bacterias del suelo en donde pueden haber excrementos (que contaminan con bacterias tales como la Escherichio y la Salmonella), restos de alimentos, pajas, etc. Por otro lado si el animal no esta limpio es común encontrar en él diversas partículas contaminantes.

Si no se hace una limpieza profunda de maquinarias y utensilios que se usan en el proceso de la leche, es fácil tener contaminación, especialmente en ciertos ángulos y rugosidades de las mismas, pues ahí es donde mas fácilmente se desarrollan los microorganismos.

También se debe controlar la calidad del agua utilizada en las plantas de proceso dado que deben tener una baja cuenta microbiana y pocos cloruros, ya que estos causan problemas en la elaboración de manteca y quesos.

3.4 MICROORGANISMOS DE LA LECHE

La leche por sus características y composición es un medio propicio para el desarrollo de los siguientes microorganismos:





Levaduras

Hongos

3.4.1 BACTERIAS

Las más importantes son las bacterias lácticas y las bacterias coniformes.

3.4.1.1 BACTERIAS GRAN POSITIVAS

Son de diferentes géneros, ampliamente distribuidas en la naturaleza; se encuentran en el suelo, y en cualquier lugar donde existan altas concentraciones de carbohidratos, proteínas, vitaminas y poco oxígeno. Su forma puede ser bacilar, cocoide u ovoide; soportan pH 4 en la leche y son anaeróbicas facultativas, mesofilas y termofilas y de crecimiento exigente. Pueden ser homofermentativas (mas del 90% de su metabolismo resulta en ácido Láctico) o heterofermentativas (producen además de ácido láctico, otros ácidos y gases).

3.4.1.1.1 Bacterias ácidas lácticas

Están formadas por lactococcus, leuconostoc, pediococcus, streptococcus, lactobacillus, carnobacterium, enterococcus, vagicoccus, aerococcus, tetragonococcus, alioiococcus, bifidobacterium. Su estudio en el ámbito tecnológico es importante debido a:

- a) son formadoras de textura y ayudan al establecimiento de las condiciones para la elaboración de ciertos productos lácteos, por efecto de la acidez producida por la fermentación de la lactosa, la leche puede coagular gracias a la coalescencia de las caseínas al alcanzar el pH iso-eléctrico, lo cual es deseable en la elaboración de yogurt y quesos.
- b) en la elaboración de crema y mantequilla una ligera acidificación permite acelerar el proceso y aumenta el rendimiento, algunas especies producen polisacáridos que aumenta la viscosidad de la leche cambiando su textura. Aportan sabor y textura, el diacetilo es el principal responsable del aroma de la mantequilla.; la acetoina lo es en el yogurt, mientras que el ácido láctico aporta sabor a diversos productos fermentados. Además la producción de enzimas que intervienen en el afinado de los quesos por degradación de las proteínas y las grasas afectan notablemente las características organolépticas de los mismos. Ejercen efectos bioprocesados manifestando en la prolongación de la vida útil de los productos elaborados con sus cultivos.

3.4.1.1.2 Micrococco

Débil fermentadores, forman parte de la flora inocua que contamina la leche cruda, tiene poca actividad enzimática por lo tanto son de muy poca importancia como agentes adulteradores en leche. Sin embargo por ser la flora más abundante en leche cruda y tener cierta capacidad proteolítica pueden llegar a ser constantes de alteraciones en leche pasteurizadas mal almacenadas.

3.4.1.1.3 Estafilococcus

Son aerobios facultativos, fuerte// fermentadores, son de gran importancia desde el punto de vista sanitario; causan mastitis y provocan enfermedades o intoxicaciones en los humanos. El staphilococcus aureus produce una exotoxina que causa fuertes trastornos intestinales en los humanos, la cual es termorresistente y no es destruida por la pasteurización.

3.4.1.1.4 Bacterias Esporuladas

Los bacilos son bacterias aeróbicas con actividad enzimática variada produciendo acidificación, coagulación y proteolisis. Los clostridium son anaerobio estricto, producen gas; algunos producen toxinas patógenas como el clostridium botulinum en la leche cruda, su crecimiento es inhibido por las bacterias lácticas; cobran importancia en productos lácteos como en leche pasteurizada, quesos fundidos, leches concentradas, quesos de pasta cocida. Resisten la pasteurización por su capacidad de producir esporas, las cuales solo se destruyen a temperaturas por encima de 100°C.



3.4.1.1.5 Diversas

Otras bacterias gram positivas que pueden encontrarse en la leche son: corynebacterium, bacterias propionicas, brevibacterium, estas últimas se encuentran en la corteza de algunos quesos maduros almacenados en condiciones húmedas.

3.4.1.2 BACTERIAS GRAN NEGATIVAS

3.4.1.2.1 Enterobacterias

Son huéspedes normales del intestino de los mamíferos, por lo tanto su presencia en el agua y en la leche se relacionan con contaminación de origen fecal, estas bacterias tienen gran importancia desde dos puntos de vista; **HIGIENICO**, ya que varía de estas especies tiene poder patógeno, de los cuales la más temible es la SALMONELLA y otras que pueden provocar trastornos gastrointestinales (YERSINIA, E COLI, SHIGELLA). Y **TECNOLOGICO**; ya que son bacterias heterofermentativas, grandes productoras de gases, además producen sustancias viscosas y de sabor desagradable, todo lo cual conduce a la alteración de la leche o subproductos. De las enterobacterias, las más comunes encontradas en los productos lácteos son las del grupo coniforme. La determinación de su presencia indica calidad higiénica de la leche cruda y pasteurizada, las enterobacterias comunes de la leche cruda: E COLI, ENTEROBACTER AEROGENES, KLEBRIELLA, CITROBACTER, SALMONELLA, SHIGELLA, PROTEUS, SERRATRA.

3.4.1.2.2 Acromobacterias

Son aerobias, saprófitas, actividad enzimática limitada. Parte esencial de la microflora psicrófila que prolifera en la leche conservada a bajas temperaturas. Producen sustancias viscosas ó coloreadas. Se distinguen los siguientes géneros:

- **Alcaligenes** Como indica su nombre prefiere medios de pH básico. *A. viscolactis* produce viscosidad en la leche y *A. metalcaligenes* produce un crecimiento mucoso en la superficie del requesón. Estos microorganismos proceden del estiércol, piensos, suelo, agua y polvo. Este género también incluye a microorganismos que anteriormente eran clasificados como *Achromobacter*.
- **Flavobacterium** Las especies de este género producen pigmentos de color variable del amarillo al naranja, pueden producir coloraciones anormales. Algunas especies son psicrótrofas.

3.4.1.2.3 Diversas

Pseudomonas

Estas bacterias son bacilos gramnegativos, generalmente inmóviles. Transportadas principalmente por aguas no potables. Forman parte de la microflora psicrófila. Se desarrollan a Aw altas (0.97 a 0.98), el calor las destruye con facilidad, su crecimiento es escaso si no disponen de oxígeno, resistentes a la desecación, y su crecimiento es escaso o no crecen a temperaturas superiores a los 43°C. Poseen propiedades que las hacen de importancia en alimentos:

1. Por su capacidad para utilizar compuestos de carbono que no sean carbohidratos;
2. por producir diversas sustancias que influyen desfavorablemente en el sabor;
3. su capacidad para utilizar alimentos nitrogenados sencillos;
4. su capacidad para sintetizar sus propios factores de crecimiento o vitaminas;
5. la actividad proteolítica y lipolítica de algunas especies;
6. su tendencia aerobia que les permite un crecimiento rápido y producir productos de oxidación y mucosidad en las superficies de los alimentos;
7. su capacidad para crecer a temperaturas bajas;
8. producción de pigmentos por ejemplo ***Pseudomonas fluorescens*** (fluorescencia verdosa) y ***P. nigrifaciens*** (color negro);
- 10 Su resistencia a algunos desinfectantes y detergentes.



Brucella

Bacterias patógenas causales de la brucelosis (*B. abortus*).

The infection in humans begins with flu-like symptoms. If not treated it may develop into undulant (recurring) fevers, arthritis, and in males infection of the reproductive tract.

3.4.1.2.4 Micobacterias

Bacilo causante de la tuberculosis vehiculado por leche cruda presenta un aspecto filamentososo y afinidades con hongos.

3.4.2 LEVADURAS

Son organismos unicelulares ovalados, 3 a 5 mm de diámetro. Algunos hongos parásitos de animales crecen como levaduras y pueden presentar dimorfismo de acuerdo a las condiciones ambientales.

Se pueden encontrar en ambientes con altas concentraciones de azúcar.

De gran utilidad en industria y biología molecular porque clonan y tienen sistema de expresión de eucariotes.

En leche cruda suele encontrarse levaduras como *Candida* causante de leches espumosas debido a fermentaciones alcohólicas gaseosas

3.4.3 HONGOS

Son microorganismos eucariote, pueden existir en dos formas morfológicas:

Hongos filamentosos (crecimiento en hifas)

Unicelulares (levaduras)

- Ambas, alternan las dos morfologías anteriores de acuerdo a las condiciones fisiológicas.
- Los mohos consisten de filamentos conocidos como hifas. Estas se encuentran formando estructuras ramificadas conocidas como micelio.
- Las masas de micelio tienen la apariencia de fibras de algodón.
- No tienen gran importancia en la leche líquida.

3.5 ACCION DE LOS MICROORGANISMOS EN LA LECHE

Los micro organismos, especialmente las bacterias y los hongos realizan distintos y complejos acciones químicas en los que participan variados números de enzimas; esta actividad la desarrollan sobre el medio que los rodean, y la leche, por su composición química, ofrece un medio de cultivo apropiado, especialmente para las bacterias, es así que podemos hallar bacterias que se alimentan” básicamente de las proteínas (actividad proteolítica), sobre las grasas (actividad bioquímica lipolítica), o grasas (actividad sacarolítica).

En la proteolisis, la acción de las enzimas proteolíticas y proteinasas provoca lo que se llama “coagulación dulce” de la leche, caracterizada por la formación de compuestos de reacción, en especial aminos, a la vez que se producen desprendimientos gaseosos dando a la leche un olor desagradable. Las bacterias que mas frecuentemente provocan esta coagulación son *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas putrefaciens*, *Pseudomonas viscosa*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus liquefaciens*. Al actuar sobre las proteínas, la degradan dando compuestos como peptidos, aminoácidos, amonis.

En la sacarolis (actividad bioquímica sobre el azúcar de la leche), la lactosa se desarrolla en glucosa y galactosa, para luego por fermentación, producir ácido láctico. Se produce también una coagulación que, a diferencia de la proteolítica, es de naturaleza ácida, provocando un cierto olor agradable por la formación de algunos gases como el diacetilo.



En los microorganismos responsables de esta coagulación ácida tenemos: *Streptococcus lactis* y *Streptococcus cremoris*, que forman fundamentalmente ácido láctico (por eso son homofermentativos); en cambio la *Leuconostocitrovarum*, aporte de ácido láctico forma otros compuestos tales como acetoina y el ya nombrado diacetilo (que proceden del ácido cítrico presente en la leche).

Otro tipo de bacterias sacarolíticas son: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* (estos son homofermentativos); *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentis* (estos dos son heterofermentativos), *Microbacterium lacticum*, *Micrococcus luteus* y otros.

Por último, en la lipólisis (actividad química de los microorganismos sobre la materia grasa), distintas bacterias y hongos provocan la descomposición de la grasa degradándola a glicerina y ácidos grasos.

Algunos de estos ácidos grasos son los responsables del sabor rancio de algunas leches. Entre los microorganismos que inducen la lipólisis son: *Pseudomonas fluorescens*, *Achromobacter lipolyticum* y los hongos *Candida lipolytica* (es una levadura) y *Penicillium*.

Otros tipos de bacterias pueden producir gases, como las coliformes y el *Clostridium butyricum*, que es una bacteria anaeróbica, cuyo efecto puede observarse en la maduración del queso al cual le ocasiona hinchamiento.

La *Enterobacter aerogenes* provocan compuestos gomosos, por último, la *Pseudomonas ichthyosmia* provoca un típico olor y sabor a pescado debido a la formación de trimetilamina debido a la formación de trimetilamina que se genera por el ataque a la Lecitina.

3.6 INDICADORES DE CALIDAD DE LA LECHE

Básicamente, los indicadores adoptados para determinar la calidad de la leche son:

- 1. Composición (grasa y sólidos totales)**
- 2. Calidad higiénica (conteo bacteriano)**
- 3. Calidad sanitaria (Conteo celular somático)**
- 4. Inhibidores**
- 5. Adulteración**

Calidad composicional:

Es la condición que hace referencia a las características fisicoquímicas de la leche. Como indicadores de la calidad composicional de la leche se toman los contenidos de sólidos totales, proteína y grasa; sin embargo los componentes menores o las propiedades fisicoquímicas pueden ser determinantes en el comportamiento de la leche al momento de ser procesada.

Es muy importante que los componentes de la leche no sufran degradación por procesos de fermentación, proteólisis, lipólisis u oxidación, pues estas alteraciones afectan los rendimientos tecnológicos y la calidad de los derivados lácteos. La fermentación de la lactosa afecta principalmente el nivel de acidez, y si es muy extrema la viscosidad, mientras que la proteólisis, lipólisis y oxidación afectan principalmente el aspecto, sabor y olor; para evaluarlos objetivamente son necesarios métodos químicos específicos. Para prevenir estos daños es importante conocer los factores que promueven estas reacciones.



- Características fisicoquímicas de la leche entera según Código Alimentario Argentino:

REQUISITO	UNIDADES	VALOR NOMINAL	METODO DE ANALISIS
Materia Grasa	g/100 ml	Mín. 3,0	ISO 2446:1976 (E) Pipeta 11 ml
Proteínas Totales	g/100g	Mín. 2,9	ISO 8968-2-IDF 20-2:2001 (E)
Densidad	15 ° C g/cm ³	1,028 a 1,035	AOAC 15° Ed. 925.22
Acidez	g ácido láctico/100 ml	0,13 a 0,18	AOAC 15 Ed. 947.05
Extracto Seco No Graso	g/100 g	Mín. 8,2	FIL-IDF 21 B:1987 e ISO 2446: 1976 (E)
Descenso Crioscopico	m ° C	Máx. -512	Norma ISO 5764-IDF 108:2002 (E)
Prueba de Alcohol	-----	Estable	FIL-IDF 48:1969
Prueba de Ebullición	-----	Estable	GODET y MUR (1966)

Calidad higiénica:

Es la condición que hace referencia al nivel de higiene mediante el cual se obtiene y manipula la leche. Su valoración se realiza por el recuento total de bacterias RTB (mesófilas aerobias totales) y se expresa en unidades formadoras de colonia. Anteriormente se utilizaba la prueba del azul de metileno, que aunque era de fácil aplicación no resultaba del todo precisa para evaluar la calidad higiénica de la leche. El recuento de mesófilas aerobias es un buen indicador para leches calientes, pero para leches refrigeradas, es posible que el recuento de psicrófilos y psicrótrófos sea más adecuado. Los valores normales para el RTB deben ser menor a 100.000 UFC/ml, mientras que para la leche pasteurizada está entre 40.000 y 80.000 UFC/ml. Para obtener un buen recuento de bacterias en leche las principales herramientas son la higiene, la refrigeración, la minimización del tiempo de almacenamiento, pero de ninguna manera se deben utilizar sustancias químicas que son consideradas adulterantes.

Calidad sanitaria:

Para lograr una buena calidad sanitaria es imprescindible el adecuado control de la mastitis subclínica, así como mantener el rodeo libre de brucelosis, tuberculosis, y participar de los planes de control de fiebre aftosa, que junto con la leucosis bovina se transforman en barreras no arancelarias que dificultan la colocación de productos lácteos en el mercado internacional.

El conteo de células somáticas es el método más utilizado para el diagnóstico de mastitis subclínica. Se recomienda llevar a cabo como mínimo una vez al mes.

Es importante realizar un seguimiento de los valores de células somáticas y no basarse en análisis puntuales, ya que factores ambientales, nutricionales y de manejo, pueden hacer variar los resultados de estos análisis. Los valores normales de células somáticas deben ser menor a 400.000 Cel/ml.

Inhibidores y antibióticos:

Se entiende por inhibidor a toda sustancia ajena al proceso de secreción de la leche que frena el desarrollo bacteriano, produciendo por lo tanto perjuicios en la industria al no permitir el normal desarrollo de los fermentos. Los inhibidores más comunes son: cloro, agua oxigenada e yodóforos. Para evitar la presencia involuntaria de estos en la leche, es importante eliminar completamente desinfectantes y detergentes utilizados en el lavado y desinfección del equipo de ordeño y de tanques de almacenamiento y de tarros lecheros.

La presencia de antibióticos no sólo se debe a tratamientos intramamarios, sino también a tratamientos por vía oral o inyectable que se apliquen a la vaca lactando. Debido al perjuicio que estos presentan para la industria y para la misma salud humana, ya que algunos de ellos no son destruidos en el proceso de pasteurización, es imprescindible el descarte de la leche de animales tratados por el período que indique el producto o por indicación veterinaria.



3.7 FACTORES QUE AFECTAN EL DESARROLLO DE LOS MICROORGANISMOS

Sobre los microorganismos se pueden ejercer acciones bacteriostáticas (para frenar su reproducción sin matarlos) o bactericidas (para eliminarlos); algunas de estas acciones son producidas por los mismos microorganismos a raíz de los productos que ellos mismos generan (ácidos), otras en cambio, se realizan expreso (agregado de desinfectantes, manejo de la temperatura, etc).

3.7.1 ACCIÓN DE LA TEMPERATURA

A los microorganismos se los mata con el calor y mientras más dura el calentamiento, más seguridad hay de haberlos destruidos; de allí que cuando se calienta la leche a elevadas temperaturas muchos microorganismos mueren.

Industrialmente el tratamiento con calor que se utiliza es la pasteurización, la cual se puede efectuar en tinas o en los equipos de pasteurización continua. No obstante, es importante recordar que existen microorganismos termodúricos que resisten la temperatura de pasteurización. Por otro lado, las bajas temperaturas detiene el desarrollo de la mayoría de los microorganismos.

3.7.2. ACCIÓN DE LA HUMEDAD

Los microorganismos, al igual que todos los seres vivos, necesitan agua para vivir y desarrollarse. Por eso, mientras más "seco" sea un lugar, menos posibilidades tienen los microorganismos de vivir allí. Este es el principio de conservación de la leche en polvo y de todos los demás productos deshidratados. Cuando el agua es escasa, la mayoría de los microorganismos no puede multiplicarse y por lo tanto no "degradan" ni "alteran" el lugar en que se encuentran.

3.7.3. ACCIÓN DE LA ACIDEZ

Los microorganismos prefieren un determinado grado de acidez para vivir, así por ejemplo los microbios de la putrefacción no pueden sobrevivir en medios ácidos; por eso si el queso, o el yogurt tienen suficiente ácido láctico producido por los microorganismos del fermento, se conservarán más tiempo.

3.7.4. ACCIÓN DE LOS AGENTES DE LIMPIEZA Y DE LOS DESINFECTANTES

Los agentes de limpieza que llegan a la leche como contaminantes, afectan el desarrollo microbiano. Los productos más usados en la industria láctea son la soda cáustica y el fosfato trisódico, ácido fosfórico y ácido nítrico.

Los desinfectantes en cambio son bactericidas, matan los microorganismos. Los más utilizados en la industria y en los tambos son los productos a base de iodo o cloro (iodados o clorados).

Es muy importante lavar y desinfectar bien todos los equipos y utensilios de la planta que están en contacto con la leche pero luego, debido a que su acción es tan fuerte, se debe tener la precaución de enjuagar con abundante agua limpia, para quitar todos los restos de los mismos, evitando así que entren en contacto con la leche.

3.7.5. ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos son remedios que se utilizan para curar al hombre y a los animales de las enfermedades infecciosas; actúan matando los microorganismos; para cada tipo de microorganismo hay un antibiótico específico. Los microorganismos lácticos, son muy sensibles a los antibióticos y ante la presencia de éstos en general mueren.

Esto es lo que ocurre en las leches de vacas mastíticas (que son tratadas con antibióticos), a punto tal que una pequeña cantidad de leche mastítica puede dificultar la elaboración y dañar el producto final. Por ello, cuando se trata una vaca con antibióticos, es importante dejar pasar 3 a 5 días antes de utilizar la producción de ese animal para la elaboración, de este modo hay seguridad de que se eliminaron la mayoría de restos del medicamento.



3.7.6.- ACCIÓN DEL OXÍGENO

Algunos microorganismos necesitan oxígeno para vivir y otros no. Conocer cual de ellos pertenece a cada grupo, permite "ajustar" los métodos de conservación de alimentos y descubrir el origen de algunos defectos; por ejemplo, los hongos no pueden desarrollarse sin oxígeno, en caso que estos aparezcan en un envasado al vacío, dan pautas que el problema es el envase.

3.7.7. EL BACTERIÓFAGO

Los bacteriófagos son virus patógenos que atacan a los microorganismos, sobre todo afectan a las bacterias que componen los fermentos lácticos. La multiplicación de los bacteriófagos puede ser tan enorme que pueden acabar rápidamente con el fermento acidificante.

Los bacteriófagos son más pequeños que los microorganismos y son los parásitos naturales de estos últimos; también se los suele llamar "fagos".

3.8 DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES EN LA LECHE Y SUS PRODUCTOS

El recuento de Bacterias Coliformes, es el mejor indicador del grado de higiene bajo la cual se practico el ordeño. Dentro del llamado "grupo coliforme" se incluyen todos los bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, capaces de fermentar la lactosa con producción de gas y ácido en 48 horas, en medios de cultivo sólidos o líquidos. Los géneros que integran este grupo son Escherichia, Enterobacter, Citrobacter y Klebsiella (Flia. Enterobacteriaceae), siendo las especies más importantes Escherichia coli y Enterobacter aerogenes

El primero en particular es huésped normal del tracto intestinal del hombre y los animales de sangre caliente, por lo cual se encuentra en grandes cantidades en las heces y el estiércol. El segundo (E. aerogenes) también se presenta en las heces, pero mas frecuentemente se origina del suelo y materia vegetal en descomposición. La presencia en el agua de estos microorganismos se considera inaceptable, asociándose con contaminación fecal y por ende con la posible presencia de otros microorganismos patógenos de origen intestinal, como por ejemplo las especies del género Salmonella productoras de la fiebre tifoidea y disenterías bacilares.

La leche cruda se contamina corrientemente con bacterias coliformes, derivadas directa o indirectamente del tracto intestinal de las vacas, animales que afortunadamente no sufren las infecciones entéricas propias del hombre. Esta contaminación puede provenir del estiércol, polvo, suelo, alimentos del ganado, agua, insectos (especialmente moscas) o del contacto con residuos lácteos que quedan en los utensilios de ordeño y tanques de transporte o almacenamiento, mal lavados y saneados; donde esas bacterias suelen desarrollarse con gran facilidad. Por estas razones, es sumamente difícil producir leche cruda libre de coliformes, dándole a su presencia una significación diferente que en el agua, y aunque es indeseable, se tolera. No obstante, altas cuentas bacterianas de coliformes son indicativas de condiciones insanas de producción, transporte o almacenamiento y producen defectos en la leche (sabores desagradables), razones suficientes para evitar su desarrollo, mediante buenas prácticas de producción.

En la leche pasteurizada, a diferencia de la leche cruda, la presencia de bacterias coliformes es inaceptable ya que a las temperaturas de pasteurización se destruyen. Por lo tanto, una prueba de coliformes positiva en productos lácteos pasteurizados denota mala pasteurización y aunque este hecho generalmente se descubre por la prueba de fosfatasa, la colimetria a veces resulta mas sensible. Además, un resultado coliforme positivo puede indicar recontaminación post- pasteurización, bien sea por los equipos sucios o defectuosos (escapes de leche cruda, escapes de vapor condensado, etc.) por los trabajadores (manos, ropa, etc.) o por envases mal desinfectados. Ahora bien, como no hay forma de establecer si los coliformes se originaron en la vaca o de un ser humano, cuyas heces si pueden ser portadoras de otros microorganismos patógenos, la leche pasteurizada coliforme-positiva debe rechazarse.



La determinación de bacterias coliformes en la leche y otros productos lácteos pasteurizados, es sumamente importante tanto en los laboratorios de control de calidad de las industrias del ramo como la de las agencias gubernamentales de sanidad. Ello puede efectuarse por diferentes métodos, siendo los más comunes las llamadas pruebas de fermentación, las cuales han sido clasificadas en presuntivas, confirmativas y completas.

Estas determinaciones pueden continuarse con pruebas de diferenciación de especies de coliformes, siendo muy recomendables las pruebas bioquímicas del IMViC y McKeenzie.

3.8.1 PRUEBAS PRESUNTIVAS

Las pruebas de fermentación presuntivas, para establecer la presencia de coliformes en la leche y derivados, pueden efectuarse siguiendo dos procedimientos:

a) Utilizando un medio líquido selectivo en tubos de fermentación (tipo Durham) como el caldo lactosado-bilis-verde brillante (CLBVB) o el caldo lactosado-peptona-ricinoleato-formiato. Estos medios se recomiendan cuando se desea analizar volúmenes relativamente grandes de leche (5 a 100 mL). En el CLBVB, el colorante (verde brillante) y la bilis actúan como inhibidores del crecimiento de las bacteria Gram positivas, pero permiten el desarrollo de las Gram negativas; la lactosa sirve como sustrato a las bacterias coliformes que la fermentan en 48 horas a 32 o 35°C, formando ácido y gas el cual es recolectado en los tubos de fermentación, demostrando el crecimiento de las bacterias coliformes. Cuando se emplean 5 tubos del medio líquido para cada una de 3 diluciones diferentes de leche (10, 1 y 0,1 mL) es posible obtener valiosa información, que con la ayuda de tablas especiales permite hacer un cálculo aproximado del número de bacterias posiblemente presentes en la muestra, resultado que se expresa en términos del "Número Mas Probable" de coliformes por unidad de volumen (Ej.: NMP/100 mL).

En forma similar puede emplearse el caldo lactosado peptona-ricinoleato-formiato, en el cual el ricinoleato sódico actúa como inhibidor de las bacterias Gram positivas, pero no de las Gram negativas, en tal forma que los coliformes crecen formando gas a partir de la lactosa, reacción que es acelerada por el formiato de sodio.

b) Utilizando un medio selectivo sólido en placas como el agar-lactosa-desoxicolato-formiato o agar bilis-rojo neutro-cristal violeta. Los medios sólidos se emplean generalmente para el control sanitario de leches pasteurizadas, con el objeto de establecer si cumplen las normas sanitarias (máximo conteo de bacterias/mL). Tienen la ventaja de que permiten obtener resultados cuantitativos en una sola placa. Sin embargo, no se emplean cuando se necesita utilizar volúmenes grandes de muestra. Los coliformes crecen fácilmente en el agar lactosa-desoxicolato-formiato, ayudados por la presencia de lactosa que fermentan produciendo ácido que hace cambiar el pH y virar el indicador (rojo neutro) de amarillo a rojo; el desoxicolato inhibe el crecimiento de los germen Gram positivos. El periodo de incubación de las placas con este medio, no deber ser mayor a las 24 horas, preferiblemente 20 horas, ya que otros microorganismos pueden crecer ocasionando confusión. Por ello solo se cuentan aquellas colonias rojas de diámetro mayor a los 0,5 mm, rodeadas de un alo de desoxicolato de sodio precipitado.

Además, las placas se deben preparar con una capa fina superficial de medio, superpuesta, para obtener las colonias de coliformes ligeramente por debajo de la superficie y evitar sean confundidas con colonias superficiales. De manera similar se usa el agar bilis-rojo neutro-cristal violeta, donde la bilis y el colorante inhiben el desarrollo de los microorganismos Gram positivos, mientras que el rojo neutro actúa como indicador.

Las bacterias coliformes crecen en este medio en 24 horas, formando colonias de color rojo púrpura (por debajo de la capa superpuesta) de 1- 2 mm de diámetro, rodeadas de una zona rojiza de bilis precipitada.

3.8.2 PRUEBAS CONFIRMATIVAS

Cuando se requiere confirmar la evidencia obtenida en una prueba presuntiva sobre la posible presencia de bacterias coliformes, se acostumbra continuar el análisis con una prueba confirmativa. Esta puede efectuarse por dos procedimientos:



a) Utilizando un medio selectivo sólido para “repicar” o “transplantar” los microorganismos (presuntamente coliformes) cuando la prueba presuntiva previa se ha hecho en medio líquido. Con tal fin se utiliza comúnmente el agar de Levine, en el cual las bacterias coliformes se “confirman” por las características de sus colonias. En este medio, las colonias de *Escherichia coli* se presentan planas o ligeramente cóncavas, de color oscuro con el centro negro, brillo metálico verdoso (a la luz refleja) con tendencias a unirse y con un tamaño de 2-3 mm. En cambio, las colonias de *Enterobacter aerogenes* se observan más levantadas, marcadamente convexas, de color menos oscuro que la especie anterior, con el centro marrón, sin el brillo metálico que caracteriza a las de *Escherichia*, y con un tamaño mayor, generalmente de 4-6 mm. El medio en sí es de color púrpura. Para este fin también puede emplearse el agar Endo. Ambos medios se incuban a 32 o 35 °C por 18 - 24 horas, seleccionándose las colonias típicas para la prueba completa, cuando esta se requiere.

b) Empleando un medio selectivo líquido para “repicar” los microorganismos cultivados en la prueba presuntiva precedente en medio sólido. Con este fin se emplean comúnmente el mismo caldo lactosado-bilis-verde brillante al 2% (CLBVB). El desarrollo de gas en este medio, confirma la presencia de coliformes, si ocurre en 48 horas a 32 o 35 °C.

3.8.3 PRUEBAS COMPLETAS

Cuando se quiere comprobar definitivamente la presencia de los coliformes confirmados mediante las pruebas anteriores, el análisis puede continuarse con las llamadas pruebas completas. Estas pruebas son necesarias cuando aún existe cierta duda sobre la identidad de las colonias aisladas, especialmente en placas con profusión de colonias; o cuando además de lactosa, existe en el cultivo otra sustancia que pudiera fermentar, como ocurre cuando se siembra helados en tubos de caldo lactosado. Los procedimientos que se emplean pueden ser dos:

a) Si la prueba confirmativa se ha logrado en medio sólido y en este último se han aislado bien colonias típicas de coliformes, esto es, colonias planas o cóncavas, rodeadas de un área con brillo metálico, se seleccionan y se “repican” en tubos de fermentación con caldo lactosado (CLBVB) que se incuban a 32 o 35°C durante 48 horas y en tubos de agar nutritivo inclinado que se incuban a 32 o 35°C durante 24 horas. La prueba completa se considera positiva si se observa formación de gas en los tubos de fermentación y si al microscopio del frotis de ambos cultivos, demuestra el desarrollo de bacteria en forma de bastoncitos, Gram negativas, no esporuladas.

b) Si la prueba confirmativa previa se ha hecho “repicando” de medio sólido a líquido y se ha obtenido formación de gas (generalmente en 18-24 horas) la prueba completa se obtiene “repicando” de nuevo en medio sólido (agar Levine) que se incuban a 32 o 35°C por 18- 24 horas. Seguidamente se hacen “repiques” de colonias típicas seleccionadas como se ha indicado en (a), es decir, haciendo cultivos sucesivos en tubos de fermentación con caldo lactosado, en tubos de agar nutritivo inclinado y examen microscópico de los cultivos teñidos al Gram.

3.8.4 PRUEBAS DE DIFERENCIACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES

Una vez confirmada la presencia de bacterias coliformes, mediante pruebas de fermentación presuntivas, confirmativas y completas, utilizando medios selectivos líquidos y sólidos; y aisladas las bacterias en cultivos puros, el análisis puede continuarse con pruebas de diferenciación para establecer la identidad de la especie bacteriana. Entre esas pruebas, son recomendables las del IMViC y de McKenzie, cuyo estudio constituye el objetivo principal de esta práctica. Debe recordarse además que la identificación de las especies de coliformes puede también efectuarse por las características de desarrollo en medios selectivos ya sea en placas o en tubos de cultivo, siendo los más comunes los medios de Levine, Endo, McConkey (en placas) y el medio de Costa y Vernin (en tubos).



3.9 PATEURIZACION

La pasteurización es la operación a la que se someten determinados productos alimenticios para destruir por acción del calor los microorganismos patógenos y la mayoría de los gérmenes restantes, con fines higiénicos o de conservación, preservando al máximo las características físicas, bioquímicas y organolépticas del producto.

La pasteurización, que permite la conservación durante un tiempo determinado, se basa en las leyes de destrucción térmica de los microorganismos. Dichas leyes toman en consideración esencialmente el número de microorganismos presentes, la temperatura a la que tiene lugar el proceso y el tiempo durante el que se mantiene dicha temperatura. La pasteurización se efectúa generalmente a temperaturas inferiores a los 100 °C y debe ser seguida de un enfriamiento rápido. Siempre resulta interesante operar a una temperatura más alta durante un tiempo más breve con el fin de, obteniendo idénticos resultados bacteriológicos, conservar en mayor grado las cualidades originales del producto. Un líquido ácido se puede pasteurizar a una temperatura más baja.

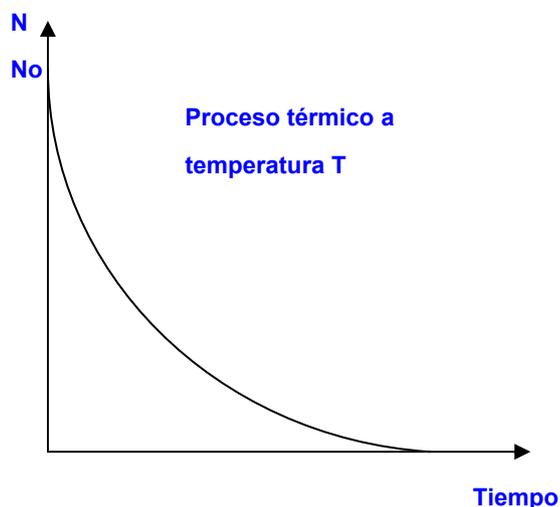
La pasteurización se puede efectuar una vez envasado el producto o previamente a esta operación. La pasteurización del producto envasado se utiliza principalmente para la cerveza, la sidra, los zumos de frutas y, a veces, el vino envasado en botella. Una vez cerradas, las botellas se someten a una aspersión con agua cada vez más caliente, hasta los 65-75 °C, y se mantienen a esta temperatura durante un tiempo que varía entre los veinte a treinta minutos; finalmente, se enfrían con agua cada vez más fría.

Estas operaciones se encadenan en un proceso continuo. Este método presenta el inconveniente de precisar de costosos aparatos y tiende, por ello, a ser sustituido por la pasteurización del producto previamente a su envasado, procedimiento que se sigue principalmente para la leche destinada al consumo (leche pasteurizada), la nata para la fabricación de la mantequilla, la leche descremada para la fabricación de leche en polvo. La pasteurización a baja temperatura (de 63 a 65 °C durante 30 minutos) ha sido sustituida prácticamente por la pasteurización a alta temperatura (de 72 a 75 °C durante 15 minutos).

Después de la pasteurización la leche debe conservarse a una temperatura no superior a los 4 °C debido a que el método de la pasteurización solo destruye las formas vegetativas y no las esporuladas. Esta también es la razón por la cual la leche pasteurizada se debe consumir en un periodo de tiempo no superior al mes, al contrario que la leche UHT que ha sido esterilizada en su totalidad, destruyendo formas vegetativas y esporuladas, por lo que dura más tiempo.

3.9.1. CINÉTICA DE LA MUERTE TÉRMICA DE MICRO ORGANISMOS

La muerte térmica de microorganismos se ajusta muy a menudo a una cinética de primer orden:





La destrucción de microorganismos por acción del calor sigue una cinética de primer orden:

$$\frac{dN}{dT} = -k_d \cdot N$$

dT

siendo:

- **N** el numero de microorganismos vivos en cada momento en cualquiera de sus formas, en células o células / ml
- **Kd** es la constante cinética de muerte térmica a temperatura T

NOTA: **k_d** depende muy intensamente de la temperatura T

Integrando la ecuación anterior para un proceso térmico que se realiza a temperatura constante (**k_d** constante) se obtiene, como en cualquier cinética de 1º orden, la conocida solución:

$$-\int_{N_0}^N \frac{dN}{N} = k_d \cdot \int_0^t dt ; \ln \left(\frac{N}{N_0} \right) = -k_d \cdot t ; \frac{N}{N_0} = e^{-k_d \cdot t}$$

$$N = N_0 \cdot e^{-k_d \cdot t}$$

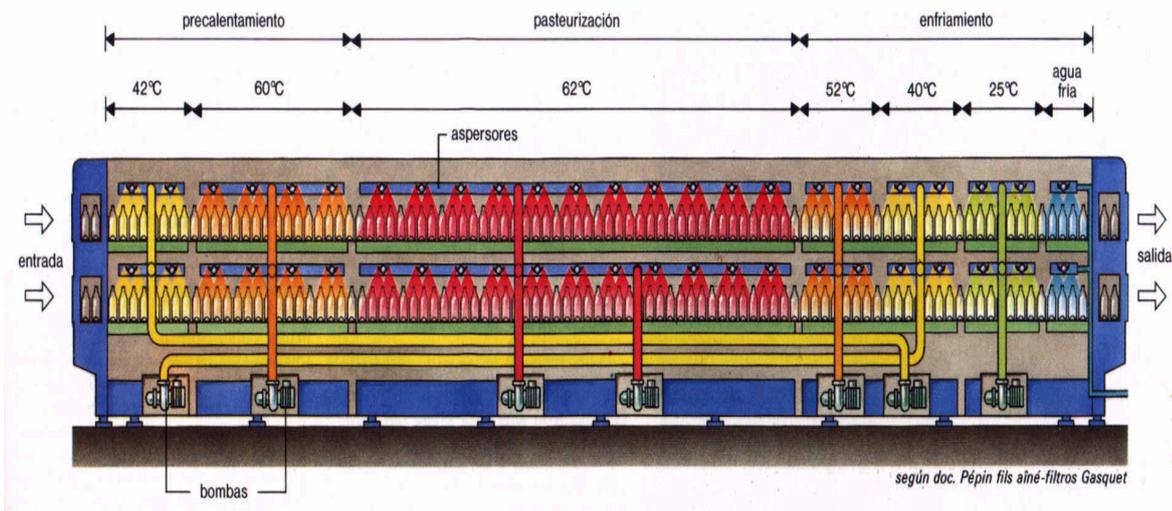
$$N = N_0 \cdot e^{-k_d \cdot t}$$

También es muy usada en base decimal. Se puede pasar a logaritmo decimales según:

$$\log \frac{N}{N_0} = \log (e^{-k_d \cdot t}) ; \log \frac{N}{N_0} = -k_d \cdot t \cdot \log e;$$

$$\log \frac{N}{N_0} = -\frac{k_d \cdot t}{2,3}$$

3.9.2. Pasteurizador: los pasteurizadores utilizados para pasteurizar la leche, son intercambiadores de calor, de placas o tubos, que utilizan como manantial de calor agua caliente, vapor o, en algunos casos, radiaciones infrarrojas. Son de acero inoxidable y constan de varias secciones: sección de intercambio de calor entre la leche fría que entra y la leche caliente que sale; sección de calentamiento, donde la leche alcanza la temperatura deseada; sección de mantenimiento, donde esta temperatura se mantiene durante el tiempo deseado; y sección de enfriamiento final de la leche, primero mediante intercambio de calor con agua fría y luego con agua helada.



4. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES MÁS IMPORTANTES EXTRAIDAS:

- Pese a los porcentajes mas comunes hallados de: materia grasa (lípidos), lactosa, sust. Nitrogenadas y minerales, en la composición de la leche, estos van a ser variables, no se pueden precisar con certeza ya que van a depender de una serie de factores, aún para una misma vaca.
- Esa variación en los porcentajes de composición de la leche determina que no todas sean iguales en sus propiedades y ello hace que determinadas leches sean mejores para la elaboración de un determinado derivado lácteo e inapropiado para otros.
- Es importante tener en cuenta que la densidad de la leche varía entre los valores de 1.028 a 1.034 g/cm³ a una temperatura de 15°C según sea la composición de la leche; su variación con la temperatura es 0.0002 g/cm³ por cada grado de temperatura, y depende de la combinación de densidades de sus componentes.
- Si la temperatura de conservación no es la adecuada, por su composición, la leche puede sufrir variaciones como consecuencia del crecimiento microbiano.
- Si la leche es sometida a distintas formas de manejo es necesario verificar los cambios en los registros de calidad microbiológica.
- Tener en cuenta principalmente de los factores que afectan el desarrollo de los microorganismos: la temperatura, la humedad y la acción acción del oxígeno.
- La existencia ácidos grasos no saturados en la leche tienen la propiedad de fijar oxígeno provocando ciertos sabores desagradables, teniendo además un punto de fusión bajo que cuanto mayor sea su presencia, la grasa será mas “blanda”.
- Considerar que la estabilidad de la materia grasa en la leche depende de la integridad del glóbulo de grasa; Como así también en las partículas depende de la membrana protectora: esta membrana puede romperse por acción de algún ácido o por la acción de ciertos microorganismos.
- La parte más compleja de la leche la constituyen las sustancias nitrogenadas (proteínas y sustancias no proteicas)

“Microbiología de la Leche”

Ing. Mauricio CELIS - Lic. Daniel JUAREZ



- Prestar especial atención en general y principalmente a los indicadores de calidad de la leche: a las grasa y sólidos totales de la composición - al conteo de bacterias coliformes en la calidad higiénica (que incluye desde otro ámbito una limpieza profunda de maquinarias y utensilios que se usan en el proceso de la leche, y por la cual si ello no se efectúa, también es fácil tener contaminación por falta de higiene), y al conteo celular somático en la calidad sanitaria, , como así también a los inhibidores y la adulteración.
- La principal fuente de energía de las bacterias es la lactosa, siendo de todos los componentes de la leche el mas constante y el que se encuentra en mayor porcentaje
- La variación (debido a la adición de ácidos o la fermentación láctica) del ph de la leche, produce la neutralización de su carga eléctrica y la destrucción de los micelos.
- Producto de lo mencionado anteriormente los micelos se aglomeran entre si y precipitan a un ph de 4.6.
- El ácido cítrico cumple la función más importante en el equilibrio de calcio en las micelas de caseína.
- Considerar que la pasteurización es el proceso por medio del cual, manteniendo las características físicas y bioquímicas, se pueden destruir los microorganismos patógenos y un gran porcentaje de los gérmenes restantes.
- El recuento de bacterias coliformes, es uno de los principales indicadores del grado higiénico de las prácticas de producción.
- Conociendo que el ph de la leche puede variar entre 6.5 y 6.65, y de acuerdo a lo detallado en el presente, es de tener en cuenta como consideración importante que: valores fuera de los mismos se producen por la acción de microorganismos alcalinizantes, por el desarrollo de microorganismos, por deficiente estado sanitario de la glándula mamaria o por la cantidad de CO_2 disuelto.
- Tener presente que la leche, por su composición química, ofrece un ámbito favorable de cultivo, especialmente para micro organismos (bacterias y hongos) efectuando diferentes acciones químicas.
- Finalmente y como se enunció, es muy importante que los componentes de la leche no tengan alteraciones por procesos de proteólisis, fermentación, lipólisis u oxidación, ya que las mismas influyen en los rendimientos tecnológicos y en la calidad.