

300627



UNIVERSIDAD LA SALLE

**ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U.N.A.M.**

25
Dej

**IMPLEMENTACION DE UN
METODO TURBIDIMETRICO PARA
EVALUACION DE CARGA
MICROBIANA EN LECHE
REHIDRATADA PASTEURIZADA**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA
THELMA RIVERA VELAZQUEZ**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E.

	Pag.
Objetivos	1
Introducción	3
Generalidades	11
Materiales y Métodos	35
Resultados	47
Conclusiones y Recomendaciones	75
Bibliografía	78

O B J E T I V O S .

En el presente trabajo se pretende desarrollar y aplicar a nivel rutinario una técnica que proporcione resultados confiables acerca de la calidad sanitaria de la leche rehidratada pasteurizada en menos tiempo que el empleado en la técnica oficial actualmente usada.

Al mismo tiempo, el método aquí propuesto pretende que la operación sea más sencilla y la utilización de menor cantidad de materiales que el que es utilizado hasta ahora.

Al tratarse de un alimento altamente perecedero, cuyo manejo y distribución es sumamente rápido, el desarrollo de técnicas microbiológicas expeditas, resulta de gran utilidad como auxiliar en el control de la calidad, para favorecer la productividad y ayudar al mantenimiento de la salud pública.

INTRODUCCION

La leche de vaca es de un alto valor nutritivo, fundamental para el desarrollo del ser humano, por ello está considerada como alimento básico en la nutrición infantil (después de la leche materna), así como para las mujeres embarazadas y para aquellas en período de lactancia (28).

Debido a sus características nutritivas, es un medio muy apropiado para el crecimiento microbiano lo cual trae como consecuencia un elevado riesgo de proliferación haciéndose necesario conocer oportunamente la carga y tipos microbianos presentes en este producto.

La leche secretada por una ubre sana está estéril; al ser un medio sumamente nutritivo puede contaminarse rápidamente con microorganismos, estos pueden llegar a la leche por diferentes causas y vías como son:

- a) El animal mismo: cuando existen gérmenes en la ubre éstos pasan a la leche (p. ej. el bacilo tuberculoso); de manera indirecta por los excrementos que pueden llegar al producto debido a un inadecuado manejo del mismo; la proximidad de otros animales.
- b) EL medio exterior como agua, suelo y equipos.
- c) El hombre: por una inadecuada higiene de manos, vestidos; expectoraciones, etc.

A menudo la leche se traslada el mismo día en que se ordeña a la planta donde será industrializada. El manejo se hace ya sea en botes de 40 litros o pipas de hasta 20,000 litros. Al llegar a la planta de procesamiento, el producto es sometido a inspecciones y

pruebas para controlar su calidad, esto es, determinar los contenidos de grasa y humedad, detectar alteraciones y adulteraciones y en base a estos resultados decidir su procesamiento y uso.

Las pruebas a las que la materia prima o producto terminado es sometido incluyen determinaciones tanto fisicoquímicas como microbiológicas y organolépticas tales como: contenido de grasa y de sólidos totales; cálculo de sedimentación; determinación del punto de congelación como índice de la posible adulteración con agua; determinación de cuentas microbianas, particularmente cuenta total, coliformes, hongos y levaduras y evaluación de sabor.

En circunstancias especiales también se hacen pruebas para descubrir residuos de antibióticos (que provienen de vacas tratadas) y residuos de insecticidas (que pueden haberse introducido a la leche a través del alimento de la vaca o de otros materiales en la lechería) (24).

Posterior a la recepción de la leche, ésta pasa al proceso de pasteurización. La eficacia en la destrucción de los gérmenes por las altas temperaturas, depende, en parte, de la concentración inicial de los mismos.

En el caso de la leche, la pasteurización persigue una doble finalidad:

- 1) Destrucción de todos los gérmenes patógenos para el hombre; aspecto importante desde el punto de vista higiénico.
- 2) Reducción de la flora banal al nivel más bajo posible con el fin de mejorar la "calidad de conservación"; éste es el punto de vista económico y comercial que tiene tanta importancia como el primero.

Existen dos diferentes procesos para efectuar la pasteurización:

- a) El denominado Baja temperatura-Tiempo largo que se lleva a cabo a $62^{\circ} - 63^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos (1).
- b) El llamado Alta temperatura-Tiempo corto que se efectúa a 72°C por 15 segundos (1).

El objetivo principal de estos procesos es el dar al producto el tratamiento mínimo necesario para que se mantenga entre 3 y 6 días en condiciones de refrigeración ($4^{\circ} - 7^{\circ}\text{C}$), que es el manejo normal de la leche, y que al mismo tiempo mantenga sus propiedades físicas, organolépticas y nutritivas.

Después de un correcto proceso de pasteurización, como ya se mencionó anteriormente, el producto carece de microorganismos patógenos y se ha reducido la cuenta total viable.

Posterior a este proceso, el producto puede contaminarse durante su manejo subsecuente, esto es, durante su conducción, almacenamiento y envasado, además los microorganismos sobrevivientes se reproducen siendo en última instancia los responsables del deterioro del producto.

Las cuentas y tipos bacterianos finales desempeñan un papel determinante en la calidad sanitaria de la leche, que en gran parte determina la clasificación a la que está sometido este producto. De

acuerdo a la Dirección General de Normas de la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, la leche se clasifica de la siguiente manera: (15, 16).

	Cuenta de meso- filicos aerobios (col/ml)	Coliformes - (col/ml)	Inhibidores microbianos
Leche pasteurizada Preferente Extra	15 000 máx.	menos de 5	Neg.
Leche pasteurizada Preferente	30 000 máx.	menos de 10	Neg.

Una de las razones del interés en métodos para la determinación de la contaminación post-pasteurización, es porque generalmente hay una relación entre la contaminación posterior al tratamiento térmico y la vida de anaquel del producto terminado.

Al determinar este tipo de contaminantes, se detectan tres grandes problemas:

- a) Primero, la prueba ideal debería indicar el número exacto de microorganismos que de alguna manera llegaron al producto después de la pasteurización.
- b) Segundo, la prueba ideal debería proporcionar resultados en el menor tiempo posible.
- c) Tercero, esta prueba debe ser sencilla y económica.

Desafortunadamente, en la actualidad no se cuenta con

un método que satisfaga todos los requisitos anteriores.

Debido a esto se han llevado a cabo varios trabajos encaminados al desarrollo de métodos que simplifiquen los tradicionales, casi todos enfocados a la reducción del tiempo empleado (5).

Dentro de estas técnicas simplificadas encontramos primeramente, y como ejemplo más sencillo, la tradicional prueba del azul de metileno que estima cualitativamente la carga microbiana presente en la leche. Esta prueba es usada generalmente como criterio de aceptación en andén.

En años recientes se han desarrollado métodos enfocados a la cuantificación rápida de microorganismos en leche, ya sea cruda o pasteurizada.

Un grupo de microorganismos que ha recibido especial atención en esta área de investigación es el de los psicrotróficos (el término psicrotrófico es usado en la 13a. edición del Standard Methods for the Examination of Dairy Products para los microorganismos que son capaces de formar colonias visibles en agar para cuenta estandar incubado a 7°C por 10 días), esto debido a la gran importancia que tienen en la conservación refrigerada de estos productos y al considerable tiempo que implica su detección. Las alternativas propuestas son muy variadas y entre ellas se tiene el incrementar la temperatura de incubación para así disminuir el tiempo de la misma (20); usar ciertos medios selectivos que permitan el crecimiento de contaminantes pero inhiban el crecimiento de otras bacterias (6); detectar ciertos productos finales del metabolismo microbiano o cambios en el sustrato

(por ejemplo la producción de catalasa, presencia de ácido pirúvico, reducción de colorantes, etc.) (18, 29) o aplicando la muestra en la superficie del agar para acelerar el crecimiento de los microorganismos aerobios (5, 25, 10, 21, 29).

Para otros grupos de microorganismos, se han propuesto métodos como el de microtitulación, el cual se ha utilizado para ennumerar células viables en leche, evaluar la destrucción térmica de esporas y que presenta buena correlación con respecto a los métodos oficiales evaluando mesofílicos, psicrotrofos y coliformes en leche bronca (12, 8).

También existen métodos que se basan en el hecho de que la impedancia eléctrica de un medio se ve alterada por los cambios químicos resultantes del metabolismo microbiano y su crecimiento (7, 11, 29, 30).

En este investigar constante, se han desarrollado instrumentos como el Biocounter M2010 computarizado, que proporciona, a partir de muestras alimenticias, cuentas de coliformes en 4 horas y esterilidad en 6 a 16 horas (19), y el Bactec, sistema radiométrico desarrollado por Johnston Laboratories que proporciona resultados en 6 a 8 horas (3).

Teniendo como antecedentes los parámetros obtenidos por Toro Vázquez (27), en este estudio se trata de desarrollar una técnica turbidimétrica basada en el incremento de la densidad óptica de un medio al desarrollarse los microorganismos inoculados en el mismo. Dicho inóculo se obtiene mediante un procedimiento centrífugo de la

muestra de leche en estudio. Por medio de esta técnica se obtienen resultados de la cuenta total o cuenta estándar en aproximadamente 6 horas, lo que implica un considerable ahorro de tiempo (casi 40 horas) al compararlo con el que toma la técnica oficial.

G E N E R A L I D A D E S .

GENERALIDADES SOBRE LA LECHE

DEFINICION

La leche es una secreción normal de las glándulas mamarias de todos los mamíferos, que tiene como finalidad básica la de alimentar a la cría durante el crecimiento. Las necesidades nutricionales de las diversas especies varían, de manera que no es sorprendente que la leche de los diferentes mamíferos se diferencien por su composición (Cuadro 2.1).

La importancia de la leche se basa en su alto valor nutritivo ya que sus componentes se encuentran en forma y proporción adecuada, de tal manera que cada una de las leches de los mamíferos representa el alimento más balanceado y propio para sus correspondientes crías. Además de proporcionar la mayoría de los nutrimentos, la leche contiene también diferentes sustancias que actúan como sistema inmunológico del recién nacido.

Desde el punto de vista legal la leche se define como el producto del ordeño higiénico, efectuado completa y profundamente, en una o más hembras de ganado lechero bien alimentado y en buen estado de salud. Esta leche no debe contener calostro (24, 4, 13).

La leche de vaca es la de consumo generalizado en la población por lo que a ella se hará referencia de ahora en adelante.

PROPIEDADES FISICAS

Aspecto.

Color blanco medio aporcelanado; cuando es muy ri-

CUADRO 2.1.
 Datos analíticos y fisiológicos sobre las diferentes clases de leches.(1)

	Composición p. 100 g							Tiempo para doblar el peso de nacimiento Dias	Duración hab. de gestación. Dias	Peso del cerebro g
	Extracto seco (total)	M.G.	Lactosa	Sales	Materias nitrogenadas					
					Totales	Proporción de				
					Caseína %	N.P.N. %				
Leche Humana	11.7	3.5	6.5	0.25	1.4	28	17	160	270	1200
Equidos										
Yegua	10	1.5	5.9	0.4	2.2	50	-	40	340	650
Burra	10	1.5	6.2	0.5	1.8	45	-		360	360
Rumiantes										
Vaca	12.5	3.5	4.7	0.8	3.5	78	5	35	285	500
Cabra	13.8	4.3	4.7	0.8	4	75	7	22	155	130
Oveja	19.1	7.5	4.5	1.1	6	77	5	20	150	
Búfala	17.8	7.5	4.7	0.8	4.8	80	-			
Reno	31.9	17.5	2.5	1.5	10.4	80	-		230	
Suidos										
Cerde	18.3	6	5.4	0.9	6	50	8	13	115	160
Carnívoros y Roedores										
Gata	20	5	5	1	9	33	-		60	25
Perra	25.2	10	3	1.2	11	50	-	9	63	
Coneja	29.3	12	1.8	2	13.5	70	-	6	35	10
Cetáceos										
Ballena	46.3	35	0.8	0.5	10	-	-			

(1) Alais, Charles.LA CIENCIA DE LA LECHE.,Compañía Editorial Continental,S.A.,México,1981.

ca en grasa presenta una coloración ligeramente crema debida en parte al caroteno contenido en la grasa de la leche.

Olor.

La leche fresca casi no tiene olor caracterfstico, pero debido a la presencia de la grasa, la leche conserva con mucha facilidad los olores del ambiente o de los recipientes en los que se le guarda.

Sabor.

La leche fresca y limpia tiene un sabor medio dulce por la lactosa que contiene, y adquiere, por contacto, facilmente sabores a ensilaje, establo, hierba, etc.

Gravedad especifica (15°C).

El valor va de 1.028 a 1.034. La densidad de la leche depende de la combinación de densidades entre sus diferentes componentes, de aquí que una leche entera tendría una densidad promedio de 1.032, mientras que una leche descremada 1.036. Una leche aguda presentaría valores menores a 1.029.

pH.

Las variaciones del pH dependen, generalmente, del estado sanitario de la glándula mamaria; de la cantidad de CO₂ disuelto en la leche; del desarrollo de los microorganismos que al desdoblar la lactosa producen ácido láctico; del desarrollo de algunos microorganismos alcalinizantes, etc. El pH normal varía de 6.3 a 6.8.

Acidez.

la acidez presentada por la leche cruda a la titulación empleada

es la resultante de 4 reacciones, de las cuales las 3 primeras representan la acidez natural.

a) Acidez Natural.

1. Acidez de la caseína anfotérica, cerca de 2/5 de la acidez natural.
2. Acidez de las sustancias naturales, CO_2 y ácidos orgánicos originales, cerca de 2/5 de la acidez natural.
3. Reacciones secundarias de los fosfatos, cerca de 1/5 de la acidez natural.

b) Acidez desarrollada.

Debido a la formación de ácido láctico a partir de lactosa por intervención de bacterias contaminantes.

Generalmente una leche fresca posee una acidez de 0.15 a 0.16 %; los valores menores de 0.15 pueden ser debidos a leches mastísticas, aguadas, o bien alteradas con algún producto químico alcalinizante. Los porcentajes mayores a 0.16 son indicadores de contaminantes bacterianos.

La determinación de acidez se lleva a cabo titulando con NaOH 0.1 N refiriéndola a ácido láctico.

Potencial de Oxido - reducción.

Al abrigo del aire, es de +0.130 voltios y expuesta a él de +0.300 voltios. El poder reductor de la leche se incrementa con la contaminación bacteriana; a medida que las bacterias se multiplican, consumen oxígeno y producen sustancias reductoras, bajando por lo tanto el cociente hasta valores negativos. Este hecho es aprovechado para seleccionar la leche según el tiempo en que el azul de metileno la rezarsurina son reducidos.

El azul de metileno se reduce a leucoazul de metileno (incolore) y la rezarsurina (azul pizarra) a resofurina (rosado) y dihidrorresofurina (incolore).

Viscosidad.

Varfa en general entre 1.7 y 2.2 centipoises. La viscosidad de la leche completa a 20°C es de 2.2 y la de la leche descremada de 1.2 centipoises.

Punto de congelación.

Una de las características más constantes de la leche es el punto de congelación que, en general, es de -0.539°C como valor promedio, teniendo un rango que va de -0.513° a -0.565°C. Esta propiedad es utilizada para detectar la adición de agua ya que ésta, al congelarse a 0°C, influye para que el punto de congelación de la leche se aproxime al del agua. Las sales y la lactosa son los componentes principales que influyen en el punto de congelación, la acidez induce a una baja de dicho punto.

Calor específico.

De la leche completa es de 0.93 a 0.94 cal/g °C; la leche descremada presenta valores de 0.94 a 0.96 cal/g °C.

Punto de ebullición.

La temperatura de ebullición de la leche se inicia a los 100.17°C al nivel del mar.

Índice de refracción.

Este valor fluctúa entre 1.3440 y 1.3485. Cuando la proporción normal entre solutos y solventes se altera, por la adición de agua o sólidos extraños, el índice de refracción disminuye o aumenta respectivamente (13).

COMPOSICION

La leche es un sistema relativamente estable debido a que todos sus constituyentes se encuentran en equilibrio formando tres estados físicos de dispersión. Los componentes de la leche se encuentran en diferentes concentraciones y varían considerablemente de acuerdo a varios factores como son: raza de la vaca, alimentación, época del año, etc. (4).

Como podemos apreciar en el cuadro 2.2., la leche es un sistema fisicoquímico muy complejo en el que cada componente se encuentra interaccionando con los otros, de tal manera que dichas interacciones ejercen una marcada influencia en su estabilidad.

La leche en general, está formada de aproximadamente 87.5 % de agua y 12.5 % de sólidos o materia seca total.

A continuación se describen los componentes más importantes.

Agua.

Constituye la fase continua de la leche y es el medio de soporte para sus componentes sólidos y gaseosos. Se encuentra en dos estados:

C U A D R O 2. 2.
Composición y algunas propiedades de la leche.(1)

	Comp. en g/l.	Estado físico de los componentes.
Agua	905	Agua libre(disolvente)+agua ligada
Glúcidos: Lactosa	49	Solución
Lípidos:	35	
Materia grasa propiamente dicha	34	Emulsión de los glóbulos grasos
Lecitina(fosfolípidos)	0.5	
Parte insaponificable(esteroles, carotenos, tocoferoles)	0.5	
Proteínas:	34	
Caseína	27	Suspensión micelar de fosfocaseína- o de calcio
Proteínas solubles(globulinas y albúminas)	5.5	Solución(coloidal)
Sust. nitrogenadas no proteicas	1.5	Solución(verdadera)
Sales:	9	Solución o estado coloidal
Citratos	2	
Fosfatos	2.6	
Cloruros	1.7	
Componentes diversos: (vitaminas, enzimas, gases disueltos)	trazas	
Densidad de la leche completa	1.032	
Densidad de la leche descremada	1.036	
pH	6.6-6.8	

(1) Mais, Charles. LA CIENCIA DE LA LECHE. Cia. Editorial Continental, S.A., México, 1981.

- a) Agua libre (intersticial): representa la mayor parte del agua y en ésta se mantiene en solución la lactosa y las sales. Es ésta la que sale de la cuajada en forma de suero.
- b) Agua de enlace: ésta agua es el elemento de cohesión de los diversos componentes no solubles y es adsorbida a la superficie de estos compuestos; no forma parte de la fase hídrica de la leche y es más difícil de eliminar que el agua libre.

Materia seca.

Está formada por los componentes sólidos de la leche. Estos sólidos, que en la leche de vaca constituyen un promedio de 12.5%, pueden ser determinados directamente por la aplicación de calor para evaporar la fase acuosa de la leche.

Un método indirecto para calcular la materia seca se efectúa mediante la relación entre la densidad de la leche y su contenido de grasa.

1.- Materia grasa. En la leche de vaca el contenido de grasa varía notablemente debido a una serie de factores muy diversos. Sin embargo, los valores más comunes se encuentran entre 32 y 42 g/l, o sea, 3.2 y 4.2%. Sus características físicas son:

Densidad	0.936 - 0.950
Punto de fusión	29° - 34°C
Punto de solidificación	24° - 29°C

La grasa se encuentra en la leche bajo la forma de pequeños glóbulos dispersos en emulsión en la fase acuosa. Estos glóbulos

tienden a subir debido a su baja densidad (0.92) que es inferior a la de la leche descremada (1.035) (13).

Los triacil gliceridos son los componentes más importantes de los lípidos de la leche ya que constituyen aproximadamente el 98% del material extraíble con disolventes no polares. Dentro de la categoría de los lípidos también están incluidos los fosfolípidos, los esteroides, los pigmentos, las vitaminas liposolubles A, D, E y K y otras sustancias en concentraciones muy bajas, como se observa en el cuadro 2.3. (4).

Los fosfolípidos presentes en la leche son la fosfatidil colina (lecitina), cefalina, fosfatidil cerina, fosfatidil inositol y la esfingomielina. Son muy importantes pues tienen varias funciones biológicas y afectan la estabilidad de la leche; actúan como emulsionantes naturales de los glóbulos de grasa.

2.- Lactosa. Es el principal carbohidrato de la leche, también se encuentran pequeñas cantidades de glucosa, galactosa, cerebrosidos y algunos aminoazúcares derivados de la hexosa amina.

En la naturaleza la lactosa solo se encuentra en la leche. Se trata de un disacárido formado por galactosa y glucosa unidas por un enlace β (1 \rightarrow 4). Existen dos isómeros, α y β que se diferencian por sus propiedades físicas como podemos apreciar en el cuadro 2.4. Las formas más estables son α hidratada y β anhidra.

Cuando se efectúa una cristalización de la lactosa a temperaturas menores de 93.5°C se produce la forma α hidratada con una estructura cristalina indeseable (provoca la llamada "arenosidad" en

C U A D R O 2. 3.
Composición de lípidos en la grasa de leche.*

Constituyente	Concentración %	Localización en la leche
Triacilglicéridos	97-98	Glóbulos de grasa
Diacilglicéridos	0.25-0.48	Glóbulos y membranas
Monoacilglicéridos	0.015-0.036	Glóbulos y membranas
Cetoácidos	0.85-1.28	Glóbulos de grasa
Acidos grasos libres	0.01-0.44	Glóbulos y leche descremada
Fosfolípidos (lecitina, cefalina y esfingomielina)	0.2-1.0	Membranas del glóbulo
Cerebrósidos	0.013-0.066	Glóbulos de grasa
Esteroles (colesterol y lanosterol)	0.25-0.40	Membranas del glóbulo
Escualeno	trazas	Membranas del glóbulo
Carotenoides	0.0007-0.0085	Glóbulos y membranas

* Badui, Salvador. QUIMICA DE LOS ALIMENTOS., 1a. ed., Edit. A1 hembra Mexicana, S.A., México, 1981.

C U A D R O 2. 4.

Propiedades físicas de la lactosa.*

	Isómeros de la lactosa	
	α H ₂ O	β
Poder rotatorio	+89	+55
Temperatura de fusión	202°C	252°C
Concentración de equilibrio a 15°C	38%	62%
Cristalización de las soluciones saturadas: por encima de 94°C por debajo de 94°C	- α -hidratada	β -anhidra -
Solubilidad a 15°C(g/100g - de agua)	7	50
Solubilidad a 100°C(g/100g- de agua)	70	95

*Badui, Salvador. QUIMICA DE LOS ALIMENTOS., 1a. ed., Edit. Alhambra Mexicana, S.A., México, 1981.

en helados y leches concentradas), si la temperatura de cristalización es mayor a 93.5°C se forman cristales de β anhidra en forma de aguja que son más solubles y dulces que los de α hidratada.

3.- Protefnas. Las casefnas y las protefnas del suero son los dos grandes grupos de protefnas de la leche; se encuentran en forma de suspensión coloidal. Las casefnas se encuentran en forma de suspensión coloidal debido a una combinación de los mecanismos de carga eléctrica e hidratación, y son polipéptidos insolubles en su punto isoeléctrico; tienden a precipitar en presencia de iones divalentes como el calcio. Las protefnas del suero de la leche están estabilizadas en suspensión coloidal por un mecanismo de hidratación cuyas fracciones son solubles en su punto isoeléctrico, son más lábiles a la desnaturalización por calor y no son tan sensibles a los iones divalentes.

Las casefnas forman el 85% de las protefnas totales y son glucosfosfoprotefnas y por definición son las protefnas de la leche que precipitan a pH=4.6 a 20°C. Existen principalmente como micelas, constituidas por cuatro fracciones de casefnas: α_s , β , κ y δ y se encuentran en una proporción de 55, 25, 15 y 5% respectivamente. La casefna δ tiene una secuencia de aminoácidos muy similar a una parte de la molécula de casefna β , y por tanto se considera que es el resultado de una degradación o una síntesis incompleta de la molécula de casefna. β .

Las fracciones α_s y β son sensibles a los iones calcio que se encuentran en forma natural en la leche, mientras que la δ es insensible a éstos pero sensible a la renina.

Las proteínas del suero constan de por lo menos 8 fracciones diferentes entre las cuales las principales son las β lactoglobulina, la α_2 lactalbúmina, las inmunoglobulinas, la albúmina bovina y las proteasas peptonas. Estas proteínas contienen aminoácidos azufrados muy lábiles al calor y las temperaturas de pasteurización desnaturalizan una fracción de ellas con la consecuente producción de grupos sulfhidrilo muy reactivos; éstos actúan como antioxidantes y por lo tanto los productos lácteos que hayan recibido un tratamiento térmico son menos susceptibles a las reacciones de oxidación.

4.- Enzimas. Se encuentran distribuidas en la leche, ya sea unidas a las micelas de caseína, a la membrana del glóbulo de grasa o en forma libre en el suero. Las más importantes son:

- | | |
|-------------|---|
| - Lipasa | - Lactoperoxidasa |
| - Proteasa | - Xantina oxidasa o reductasa
aldehídica |
| - Fosfatasa | |
| - Catalasa | - Amilasa |

La importancia de las enzimas de la leche derivada de cinco propiedades principales:

a) Algunas son factores de degradación que tienen importancia tecnológica tales como la lipasa, factor de la rancidez; la proteasa, que provoca la hidrólisis de la caseína, etc.

b) Su sensibilidad al calor permite el control del calentamiento de la leche en la zona de las temperaturas de pasteurización.

c) La cantidad de enzima depende, para algunas de ellas, del número de leucocitos o bacterias que se encuentren en la leche; de esta manera se pueden obtener datos sobre la calidad higiénica de la leche.

d) El contenido de enzimas no es el mismo para todas las leches; esta característica puede ser un medio para distinguirlas, pero en la actualidad se utiliza poco.

e) Algunas enzimas tienen actividad bactericida, y constituyen por ello una protección, desde luego limitada de la leche; es el caso de la lactoperoxidasa y la lisozima (4, 1).

5.- **Minerales.** Las materias minerales se encuentran en todas las leches en una proporción que varía de 3 a 10 g/l. La relación de concentraciones de las sales de la leche desempeña un papel muy importante en la estabilidad térmica de los productos lácteos, de tal forma que los iones calcio y magnesio tienden a inestabilizar el sistema proteico, mientras que los citratos y el fósforo lo estabilizan.

Otros elementos que se encuentran en la leche son aluminio, boro, bromo, cobre, cromo, iodo, flúor, hierro, manganeso, zinc y trazas de arsénico, cobalto y plomo.

Las vacas que padecen de mastitis segregan leches con un alto contenido de cloruros, por lo que la concentración de éstos aniones se ha utilizado como un índice de sanidad de las vacas (4, 1).

FUENTES DE CONTAMINACION.

La leche ha sido descrita como el alimento más perfecto para el hombre desde el punto de vista nutricional. Esta se produce a base de componentes de la sangre en la ubre de la vaca. La operación de ordeña estimula la liberación de hormonas que a su vez actúan sobre los músculos de la ubre causando el descenso de la leche a los cuatro canales de las tetas. La extracción puede hacerse manual o mecánicamente (24).

Desde que la leche sale de la ubre hasta que se vierte en los recipientes, toda manipulación u objeto con el que entre en contacto, es una posible fuente de contaminación. De omitir las prácticas sanitarias resulta una contaminación masiva de la leche y su rápida descomposición. En cambio, de las ordeñas que se efectúen en condiciones higiénicas resultará un producto de bajo contenido microbiano y calidad más o menos persistente.

Las fuentes de microorganismos más frecuentes de la leche y las precauciones que se deben atender para evitar que la contaminen son:

- a) Las vacas: la salud de las vacas es de primordial importancia pues de las ordeñadas asépticamente, se obtiene leche que sólo contiene un pequeño número de bacterias. Estas son saprófitas y de poca significación mientras su desarrollo sea controlado. La leche procedente de vacas con ubres infectadas contiene grandes cantidades de bacterias de las cuales algunas son patógenas. Es necesario inspeccionar periódicamente los establos para comprobar la salud de los animales.

- b) El área de ordeña: manteniendo limpia el área de trabajo y evitando las actividades que levanten polvo, será reducida la posibilidad de contaminación de este origen.
- c) Equipo para la ordeña: la fuente de contaminación más importante de la leche es el interior del equipo con el que se hace contacto; las máquinas ordeñadoras, los recipientes en los que se vierte, los tanques de almacenamiento y otros semejantes que no estén limpios y aseados con agentes físicos o químicos. La temperatura elevada (agua caliente o vapor), el cloro y los compuestos cuaternarios de amonio, son los agentes más usados con esos fines.
- d) Personal: todas las personas que participen en la ordeña deben estar sanas y seguir al pie de la letra las reglas sanitarias (22).

CONTROL DE CALIDAD

Control Bacteriológico.

La calidad de la leche se relaciona con varios conceptos. En general se consideran los siguientes:

- a) La riqueza de la leche en sus diferentes componentes. Se puede admitir, desde un punto de vista general, que cuanto más rica es la leche en materias grasas, materias nitrogenadas, vitaminas, etc. mejor será la calidad química.

- b) La calidad bacteriológica, que está en relación directa con el número y la naturaleza de los gérmenes presentes en la leche en un momento dado.

Existen numerosos y diversos métodos para apreciar la calidad bacteriológica de la leche. Los más precisos y significativos son aquellos que permiten la enumeración de los gérmenes; pero también son los más delicados y los más largos.

El análisis bacteriológico de la leche exige, en principio, el recuento de la microflora total y de los grupos microbianos más importantes, especialmente desde el punto de vista higiénico y técnico (bacterias patógenas, coliformes, termorresistentes, esporulados, productoras de gas, etc.). Evidentemente, este sistema no se utiliza para controles de rutina. Los métodos más usados son:

Cuenta total.

De una muestra de leche se hacen las diluciones necesarias para sembrar por vaciado en placa un mililitro de la dilución escogida con medio Agar para Cuenta Estándar (PCA). Una vez solidificado el medio, las cajas se incuban a 32°C durante 48 horas, al cabo de las cuales se cuentan las colonias desarrolladas.

Esta prueba se ha convertido en algo así como una tradición en el análisis microbiológico de los alimentos debido a que es una prueba sencilla de realizar y nos proporciona valores numéricos en cuanto a los microorganismos presentes en el producto.

Este método tiene ciertas limitaciones. Por ejemplo, la cuenta no representa todas las bacterias viables presentes, sino sólo las que

son capaces de crecer en ese medio físico y los elementos nutritivos suministrados. Otra limitación está asociada al hecho que tanto un conglomerado de células bacterianas, una cadena, como una sola bacteria origina una sola colonia, lo que demuestra claramente que el método de Cuenta Estándar sólo proporciona una estimación pero no el total de la población de la muestra. Una desventaja más se presenta cuando se tiene un producto con una contaminación sumamente baja (10 m.o./l p. ej.) donde se corre el riesgo de no incluir dicha contaminación dada la alicuota tan pequeña que se utiliza en éste método (1 ml).

Cuenta Microscópica Directa.

El contenido microbiano de la leche también se determina examinando microscópicamente un frotis del producto. Esta técnica conocida como método de Breed tiene los siguientes pasos: en un portaobjetos se marca un área de 1 cm^2 , se esparce en él 0.01 ml de leche, se seca y desengrasa con xilol, se fija con alcohol y se tiñe con azul de metileno al 0.3 %. Para expresar la cuenta final de bacterias por mililitro de la muestra es necesario determinar que cantidad del mililitro está contenida en un campo microscópico. La recíproca de ese número, conocido como factor microscópico (MF), se multiplica por el promedio de las cuentas de los campos microscópicos para obtener el número de bacterias por mililitro.

Algunas ventajas de la cuenta directa al microscopio son:

- 1.- Los resultados son rápidos (el procedimiento se puede efectuar en 10 a 15 min.).
- 2.- Se necesita muy poco equipo.

- 3.- Además de la cuenta, es posible identificar simultáneamente los tipos morfológicos de bacterias. Esta información es valiosa para interpretar la fuente y naturaleza de la contaminación.

A pesar de las ventajas, el método directo no se ha aceptado tan ampliamente como el de Cuenta total y algunas de sus desventajas son:

- 1.- No se pueden efectuar cuentas precisas en leches con cuentas bacterianas bajas, es decir, si el MF es de 300 000, la leche deberá contener, por lo menos, este mismo número de bacterias por mililitro para que se pueda encontrar una bacteria en cada campo.
- 2.- El método no se considera útil con la leche pasteurizada ya que algunas de las bacterias muertas también se tiñen y cuentan.

Métodos Indirectos.

Dentro de esta clasificación encontramos los siguientes.

- Pruebas basadas en el desarrollo de la flora acidificante.

La acidez y el pH están evidentemente, en relación con la proliferación de la microflora acidificante. La acidez es la característica que se determina con mayor frecuencia. Se sabe que existen variaciones naturales de este valor, por lo que la correspondencia con el recuento microbiano no es buena.

- a) La prueba del alcohol es una de las más fáciles, consiste en agregar a 2 ml de leche, 2 ml de alcohol al 68° G.L.; si se

aprecia floculación neta tendremos un resultado positivo, en cambio la ausencia de floculación indica un resultado negativo.

Existe una buena correlación entre esta prueba y la estabilidad de la suspensión coloidal, aunque ésta no depende sólo de la acidificación de la leche por las bacterias. Las leches con elevado contenido de calcio iónico o de composición anormal, especialmente las del final de la lactación, pueden coagular por el alcohol sin ser ácidas. Esta limitación de la prueba no se refiere más que a leches de pequeñas mezclas. En realidad, la prueba se utiliza todavía mucho para la selección de las leches a su llegada a la fábrica. Puede añadirse un indicador de pH al alcohol para hacer la prueba más significativa.

- b) Prueba de ebullición, efectuada tras un tiempo de conservación variable, constituye el mejor medio para medir la calidad de conservación de la leche. Como en el caso anterior, el resultado no depende sólo de la acidez de la leche. En la práctica se toman 2 ml de leche en un tubo de ensaye, que se lleva a baño maría hirviente; tras 5 minutos se comprueba la coagulación (+) o la ausencia de ésta (-).

- c) Prueba de la reductasa. Las leches, después que sale de la vaca y se expone y mezcla con el aire, adquiere un potencial de óxido-reducción alrededor de +300 mV. Al desarrollarse las bacterias en la leche, consumen oxígeno y producen sustancias reductoras que disminuyen el potencial óxido-reducción a valores negativos. El índice de desviación en el potencial de óxido-reducción depende del número y clase de bacterias y del índice de su metabolismo.

Esta desviación puede seguirse agregando un indicador adecuado a la muestra de leche e incubando en condiciones específicas. El azul de metileno y la rezaurina son dos indicadores del potencial de óxido-reducción útiles para la prueba de la reductasa.

En el caso del método que utiliza el azul de metileno, la muestra (10 ml de leche) se mantiene a 37°C y se le agrega 1 ml del indicador. Del tiempo que tarde en decolorarse el indicador dependerá la clasificación que se le dé a la leche (cuadro 2.5).

Este método es el más difundido en el mundo para apreciar la calidad de los suministros de leche a las fábricas y para fijar el precio según la calidad.
(22, 1, 13, 5).

Ocasionalmente es necesario examinar la leche o sus derivados para determinar la clase de microorganismos presentes para lo cual se necesitan procedimientos especiales; éstos se describen, de manera general en el cuadro 2.6.

C U A D R O 2. 5.
**Escalas de clasificación de la leche de acuerdo
a la prueba de la reductasa.***

Clasificación por higiene:			
Azul de metileno.			
Grado		Tiempo	Clase
1	Reducción superior a	5½ horas	Buena
2	Reducción entre	2 y 5½ hs	Regular
3	Reducción entre	20' y 2 hs	Mala
4	Reducción en menos de	20 minutos	Muy mala
Azul de metileno, 37°C.			
1	Reducción superior a	8 horas	Excelente
2	Reducción entre	6 y 8 horas	Buena
3	Reducción entre	2 y 6 horas	Regular
4	Reducción menor a	2 horas	Mala
Resazurina, 1 hora.			
1	Sin reducción		Excelente
2	Morado pronunciado a morado		Buena
3	Morado claro a rosa		Regular
4	Rosa a rosa claro		Mala
5	Blanco		Muy mala
Tabla para clasificación de leche.			
Prueba de la reductasa (Azul de metileno).			
Tiempo		Tipo	
Más de 5 horas		Bueno	
Más de 2½ horas		Aceptable	
Más de 20 minutos		Regular	
Menos de 20 minutos		Malo	

* Keating, Patrick F y Homero Gaona R., INTRODUCCION A LA -
LACTOLOGIA., 1a. ed., Editorial Limusa, S.A., México, 1986.

C U A D R O 2. 6.
Plan para aislar algunos tipos de microorganismos
en la leche.*

Tipo microbiano	Procedimiento General
Bacterias termodúricas	Las muestras de leche se calientan a 61.7°-62.8°C durante 30 min y después se siembra en placa como se describió al hablar del método de cuenta estándar.
Bacterias psicrófilas	Se sigue el procedimiento de cuenta estándar, pero las cajas de Petri se incuban a 7°C durante 10 días.
Bacterias termófilas	Se sigue el procedimiento de cuenta estándar excepto la incubación a 55°C.
Bacterias coliformes	Se inoculan medios selectivos y diferenciales.
Bacterias proteolíticas	Se sigue el procedimiento para cuenta estándar, pero se agrega 5% de leche desnatada al medio; éste se torna opaco; las bacterias proteolíticas digieren la caseína y mostrarán zonas claras rodeando la colonia.
Estreptococos patógenos (beta hemolítico)	Se sigue el procedimiento que aquí se describe: una muestra de leche se inocula en un medio de agar sangre, se incuba y se observa la formación de colonias que muestran zonas de beta hemólisis; se hace frotis y tinción de Gram de estas colonias.
Levaduras y hongos	Se inocula medio de papa glucosada (pH=3.5) y se incuba entre 21° y 25°C durante 5 días.

*Pelczar, J., MICROBIOLOGIA., 2a. ed. Edit. MacGraw-Hill de México, S.A., México. 1982.

MATERIALES Y METODOS.

MATERIALES.

En el desarrollo del presente trabajo se utilizaron los siguientes materiales:

- Leche rehidratada pasteurizada elaborada por Liconsa.
- Espectrofotómetro Junior II, Coleman.
- Baño metabólico con agitación, Eberbach Corporation.
- Centrífuga Sorval RC-5B refrigerada, DuPont Instruments.
- Rotor SS-34 Sorval, DuPont Instruments.
- Tubos de centrífuga con capacidad de 30 ml.
- Matraces nefelométricos de 250 ml con tubo de 15 mm de diámetro exterior.
- Tubos de ensayo con tapón de rosca con capacidad de 15 ml.
- Cajas Petri esterilizadas desechables, Plasticosmos.
- Pipetas de 1 y 10 ml.
- Estufa de incubación.
- Contador de colonias, Quebec.
- Agar para Cuenta Estándar (PCA), Merck de México.
- Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI), Bioxon de México.

METODOS.

La leche utilizada en el presente trabajo fué la rehidratada o reconstituida por Liconsa.

La leche reconstituida Liconsa es de composición cuantitativa del todo similar a la de una leche fresca pasteurizada y homogeneizada. El producto se fabrica rehidratando leche descremada en polvo con agua química y bacteriológicamente potable y agregando grasa de coco y vitaminas. La mezcla se pasteuriza (método alta temperatura-tiempo corto), homogeneiza y se enfría para almacenarla antes de ser envasada o transferida a carros tanques para su distribución (17).

En la figura 3.1 se muestra el diagrama de flujo del proceso de rehidratación.

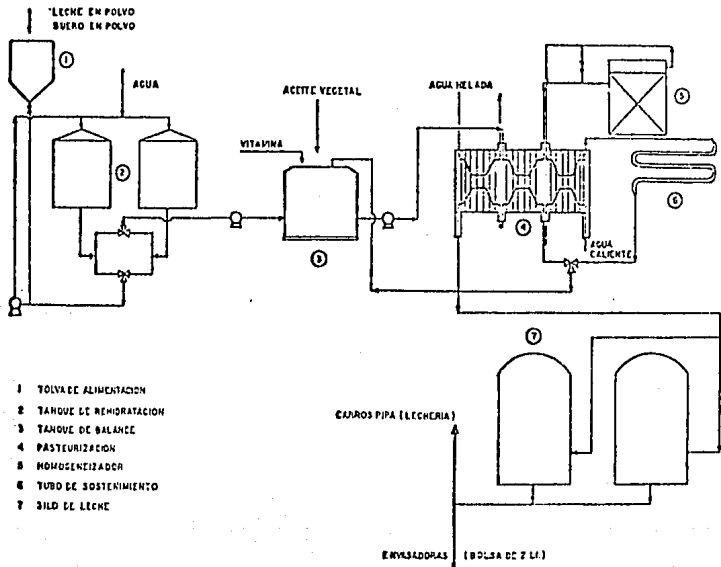
Tomando en cuenta las condiciones establecidas por Toro Vázquez (27) y adecuándolas a las necesidades de este trabajo, la metodología se llevó a cabo de acuerdo al siguiente programa:

1. Eliminación de interferencias ópticas en la leche con el fin de obtener absorbancias que correspondan preferentemente al crecimiento microbiano.

Para la realización de este objetivo se efectuaron centrifugaciones de la leche a diferentes velocidades y tiempos hasta obtener el sistema que nos proporcionara por lo menos un 95% de recuperación microbiana. Esta recuperación se cuantificó mediante el método de cuenta total por vaciado en placa, realizando las determinaciones a la muestra sin tratamiento centrífugo, en el sobrenadante centrifugado y en el sedimento resuspendido con buffer de fosfatos a $\text{pH} = 7.2$.

Los sistemas probados fueron los siguientes:

Figura 3.1.
Diagrama de Flujo de leche reconstituida.



- 1 TOLVA DE ALIMENTACION
- 2 TANQUE DE REHIDRATACION
- 3 TANQUE DE BALANCE
- 4 PASTEURIZACION
- 5 HOMOGENIZADOR
- 6 TUBO DE SOSTENIMIENTO
- 7 BILDO DE LECHE

CARROS PIPA (LECHERIA)

ENVASADORAS (BOLSA DE 2 L.)

1	500 rpm	37.5 xg	20 min.
2	2800 rpm	1200 xg	20 min.
3	3600 rpm	2000 xg	20 min.
4	3600 rpm	2000 xg	40 min.
5	4000 rpm	1400 xg	40 min.
6	5000 rpm	2750 xg	20 min.
7	4000 rpm	3750 xg	20 min.
8	8000 rpm	4989 xg	20 min.

Realizando un mínimo de 3 pruebas para cada sistema.

La cuenta total por vaciado en placa o cuenta estándar en placa se llevó a cabo de acuerdo a la técnica oficial (2) que, de manera general, indica:

- 1.- Diluir la muestra.
- 2.- Adicionar 1 ml de la muestra diluida a cajas Petri.
- 3.- Añadir agar para cuenta estándar (PCA) licuado y parcialmente enfriado (43° - 45°C).
- 4.- Mezclar bien la muestra con el medio.
- 5.- Incubar a 32° después que solidifique el medio.
- 6.- Contar las colonias después de 48 horas de incubación expresándose como unidades formadoras de colonias por mililitro (u.f.c./ml) (22).

Para preparar el buffer utilizado en la resuspensión del sedimento resultante de las centrifugaciones antes citadas, se mezclan 34 g de NH_2PO_4 en 500 ml de agua destilada. Se ajusta la solución a $\text{pH} = 7.2$ con NaOH 1 N. Se lleva a un litro con agua destilada; esta es la solución madre o stock. De la solución anterior se toma 1.25 ml y se lleva a un litro con agua destilada. Se esteriliza a 121°C durante 20 minutos (26).

- II. Determinación del volumen de inóculo y longitud de onda para la lectura de absorbancia.

El volúmen adecuado de inóculo será aquél que proporcione la concentración microbiana capaz de producir cambios sensibles de absorbancia en 6 a 8 horas. Se probaron sistemas con inóculo en proporción de 2, 5 y 10 %.

La longitud de onda utilizada en la lectura de absorbancia fué, de acuerdo a la bibliografía consultada, de 610 nm (27, 11).

III. Determinación de los parámetros de crecimiento.

Para poder relacionar los valores de absorbancia con las u.f.c./ml presentes en la muestra analizada fué necesario efectuar el desarrollo matemático que a continuación se describe:

La curva típica de crecimiento microbiano se representa según la figura 3.2. dónde:

A = fase lag o de adaptación microbiana.

B = fase log o de crecimiento microbiano acelerado o exponencial.

C = fase estacionaria

D = fase de muerte.

Experimentalmente, el crecimiento microbiano puede medirse por medio de un espectrofotómetro, o sea, con mediciones de absorbancia.

Al relacionar el logaritmo natural de la absorbancia ($\ln A_{bs}$) con el tiempo de desarrollo de dicha absorbancia, resulta una gráfica como la representada en la figura 3.3., donde A_0 es la lectura de absorbancia al tiempo t_0 y A_1 la absorbancia al tiempo t_1 .

La fase exponencial del crecimiento microbiano corresponde a una línea recta cuya pendiente equivale a la constante de crecimiento del sistema representada como k .

Considerando que A_p es el valor de la ordenada al prolongar la recta exponencial entonces se dice que la constante k se define como:

Figura 3.2.

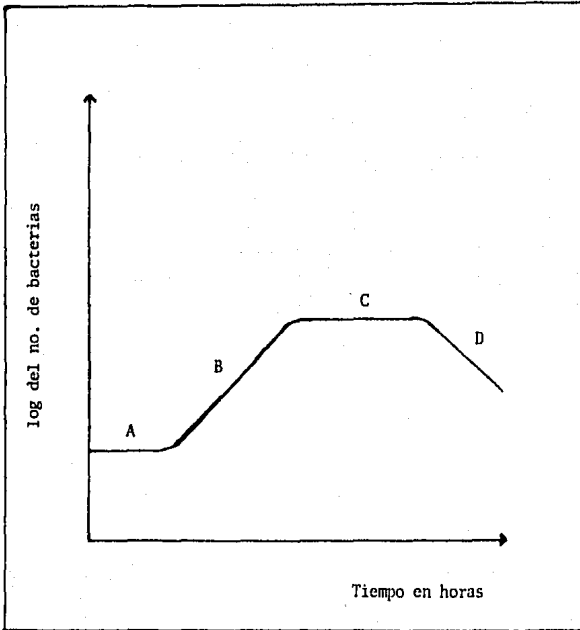
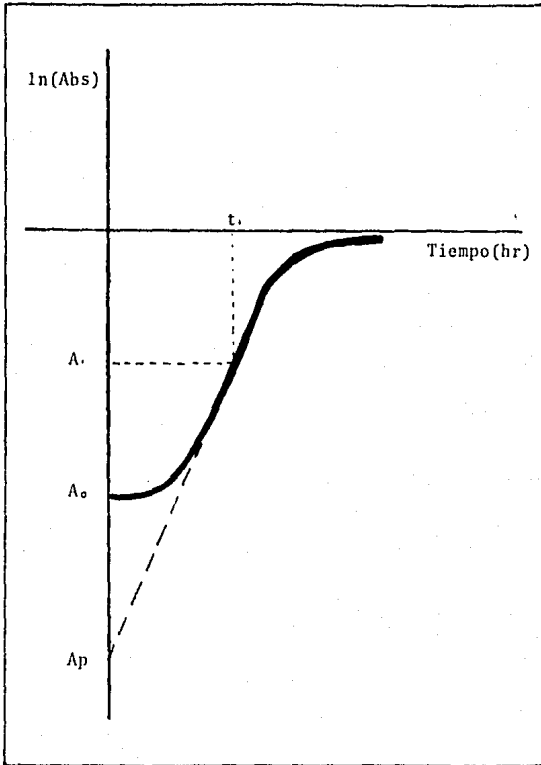


Figura 3.3.



$$k = \frac{\ln A_1 - \ln A_p}{t_1 - t_0} \dots \dots \dots (1)$$

si $t_0 = 0$, entonces:

$$k = \frac{\ln A_1 - \ln A_p}{t_1} \dots \dots \dots (2)$$

Para considerar la duración de la fase latente o de adaptación en la ecuación final, se define la constante R como:

$$R = \ln A_p - \ln A_0 = \ln \frac{A_p}{A_0} \dots \dots \dots (3)$$

despejando $\ln A_p$ de (2) resulta:

$$\ln A_p = \ln A_1 - kt_1 \dots \dots \dots (2')$$

y despejando $\ln A_p$ de (3) se obtiene:

$$\ln A_p = R + \ln A_0 \dots \dots \dots (3')$$

igualando (2') y (3') resulta:

$$\ln A_1 - kt_1 = R + \ln A_0 \dots \dots \dots (4)$$

En las condiciones del presente experimento, es difícil determinar A_0 debido a la gran cantidad de interferentes presentes, pero es posible obtenerla matemáticamente despejándola de la ecuación (4), esto es:

$$\ln A_0 = \ln A_1 - kt_1 - R \dots \dots \dots (4')$$

Para el cálculo de las constantes k y R no pueden ser utilizados los valores experimentales puesto que no son reales debido a los interferentes anteriormente mencionados, por lo que para obtener valores reales (sobre todo de la constante R) se procedió a elaborar una curva patrón de la siguiente manera: el inóculo obtenido mediante procedimiento centrífugo se agregó a medio líquido de Infusión Cerebro Corazón (BHI) estéril y se incubó a 38°C en baño agitado (100 ciclos / mfn.). Se mantuvo en esas condiciones hasta observar

un cambio de 1 a 2 unidades de densidad óptica. En ese momento se tomaron 0.2ml de manera aséptica y se agregaron a 60 ml de BHI estéril. Se incubó en las condiciones anteriormente descritas hasta que el crecimiento microbiano proporcionó lecturas de absorbancia entre 0.8 y 1 unidades de densidad óptica. Durante la incubación se tomaron alcuotas a diferentes lecturas de absorbancia para determinar la correspondiente cuenta total por el método de vaciado en placa. Con los datos obtenidos se contruyó una gráfica de absorbancia contra u.f.c./ml, de la cual se pueden obtener valores corregidos de absorbancia conociendo el número de microorganismos, o si se conoce la absorbancia, como en el caso de Ap, se puede obtener el número de microorganismos correspondientes. De esta forma es posible obtener el valor de las constantes de manera confiable para entonces poder emplearlos en la ecuación

$$\ln A_0 = \ln A_1 - kt_1 - R \quad \dots \dots \dots (4')$$

en la que se fija un tiempo constante (t) de la fase exponencial del sistema de acuerdo a las cinéticas estudiadas y utilizando los valores experimentales de absorbancia para el tiempo establecido.

Aplicando el antilogaritmo a los valores obtenidos en la ecuación (4') y relacionándolos con sus correspondientes u.f.c./ml obtenidas experimentalmente por el método oficial de la muestra de leche en cuestión, se contruyó una segunda curva estándar cuya ecuación de regresión proporciona los elementos para calcular efectivamente la carga microbiana de la muestra estudiada, dicha ecuación es:

$$A_0 = m (u.f.c./ml) + B \quad \dots \dots \dots (5)$$

Matemáticamente el valor de B es prácticamente cero y considerando que al no haber microorganismos la absorbancia debe ser cero, se puee eliminar dicho término, quedando entonces:

$$A_0 = m \text{ (u.f.c./ml)} \quad \dots \dots \dots (5')$$

Obteniendo el logaritmo natural de la ecuación (5') e igualando con la ecuación (4') se tiene:

$$\ln A_1 - Kt_1 - R = \ln m + \ln \text{ (u.f.c./ml)} \quad \dots \dots \dots (6)$$

despejando $\ln \text{ (u.f.c./ml)}$ resulta:

$$\ln \text{ (u.f.c./ml)} = \ln A_1 - kt_1 - R - \ln m \quad \dots \dots \dots (6')$$

sustituyendo los valores respectivos para las constantes k, R y m para los tiempos fijos de 6 y 7 horas y calculando el antilogaritmo de la ecuación se obtienen los factores correspondientes a cada tiempo, quedando como únicas incógnitas a determinar las absorbancias, que se obtienen experimentalmente a los respectivos tiempos de incubación, y con este dato entonces conocer el número de u.f.c./ml de la muestra analizada, esto es:

$$\text{u.f.c./ml} = x \text{ (Ax)} \quad \dots \dots \dots (7)$$

$$\text{u.f.c./ml} = y \text{ (Ay)} \quad \dots \dots \dots (8)$$

dónde:

u.f.c./ml = unidades formadoras de colonias por mililitro de la muestra estudiada.

x = factor para 6 horas

y = factor para 7 horas

Ax = lectura de absorbancia a las 6 horas de incubación

Ay = lectura de absorbancia a las 7 horas de incubación

IV. Desarrollo del método propuesto y tratamiento matemático de los resultados experimentales.

Se llevaron a cabo análisis de 15 muestras provenientes de diferentes lotes tanto por el método oficial como por el turbidimétrico. Este último se realizó tomando en cuenta los resultados obtenidos en los puntos anteriores.

Con los resultados experimentales obtenidos por ambos métodos se realizó el análisis estadístico necesario para calificarlos. Dicho análisis incluyó el cálculo de la correlación existente entre el método

propuesto y el oficial; cálculo de la exactitud del método propuesto con respecto al método oficial; comprobación de hipótesis por medio de la t de Student estableciendo ésta como la que compara dos métodos, considerando que sus promedios son iguales, no así sus desviaciones estándar, aceptándose los métodos como equivalentes si los valores de t calculada son menores o iguales a los valores de t reportados en tablas (9, 23).

V. Evaluación económica de los métodos estudiados.

Los costos implicados para llevar a cabo 10 determinaciones de cuentas microbianas tanto por el método oficial como por el turbidimétrico, fueron las bases para la evaluación económica de los mismos; estableciendo que se cuenta con la infraestructura básica de análisis microbiológico tal como servicios, autoclave, cuenta colonias, etc.

RESULTADOS.

A continuación se detallan los resultados obtenidos en los diferentes experimentos llevados a cabo para cuantificar las cargas microbianas de muestras de leche por el método propuesto en el presente trabajo y por el método oficial.

Los resultados se muestran de acuerdo al programa descrito en el capítulo anterior.

I. Como se mencionó anteriormente, para poder aplicar el método propuesto es necesario eliminar las interferencias ópticas contenidas en la leche con un procedimiento tal que permita, al mismo tiempo, retener al máximo los microorganismos presentes en la muestra. La centrifugación fué el método utilizado para éste propósito.

Los resultados generados al probar los diferentes sistemas centrifugos se muestran en el Cuadro 4.1., en el que se observa que el sistema que cumple los requisitos es el que utiliza 8000 rpm durante 20 minutos.

II. Los microorganismos aislados de la muestra láctea requieren ser inoculados en un medio líquido para su incubación. A fin de obtener la concentración microbiana adecuada a las necesidades del método en estudio, en el Cuadro 4.2. se muestran los resultados obtenidos con los diferentes porcentajes de inóculo probados. Se decidió utilizar el 10 % de inóculo.

III. La cinética de crecimiento desarrollada por el sistema microbiano en estudio se representa en las figuras 4.1. a 4.12.

Considerando la absorbancia más baja como cero o blanco, se

CUADRO 4. 1.
Sistemas Centrifugos.

rpm	rfc g's	tiempo min.	u.f.c./ml inicial	u.f.c./ml resuspendido	recuperación %
500	37.5	20	3200	30	1
2800	1200	20	2330	340	14.59
3600	2000	20	12900	3100	24.03
3600	2000	40	102	82	80
4000	1400	40	70	50	71
5000	2750	20	400	250	62.5
4000	3750	20	1750	1400	86
8000	4989	20	19000	18700	98.42

C U A D R O 4. 2.

Inóculos.

Porcentaje inoculado	Tiempo de detección en horas	Absorbancia inicial	Absorbancia final
2	+ de 7	0.085	0.085
5	6 a 7	0.15	0.165
10	6 a 7	0.32	0.345

procedió al cálculo de las constantes según el procedimiento descrito en el capítulo anterior que como primer paso indicaba elaborar una curva estándar que permitiera obtener valores reales para las constantes k y R , los valores de dicha curva se presentan en el cuadro 4.3. A continuación se enlistan los valores obtenidos para las mencionadas constantes:

k	R
2.5217126	-14.48339
2.3092296	-19.351103
2.0476928	- 7.8825969
2.3513753	-20.471586
2.9957322	-12.478659
2.2801122	- 5.8894401
3.233	-15.363519
1.9152346	- 7.8825969
2.3978953	- 3.18449619
Prom. = 2.4502205	Prom. = 11.887539

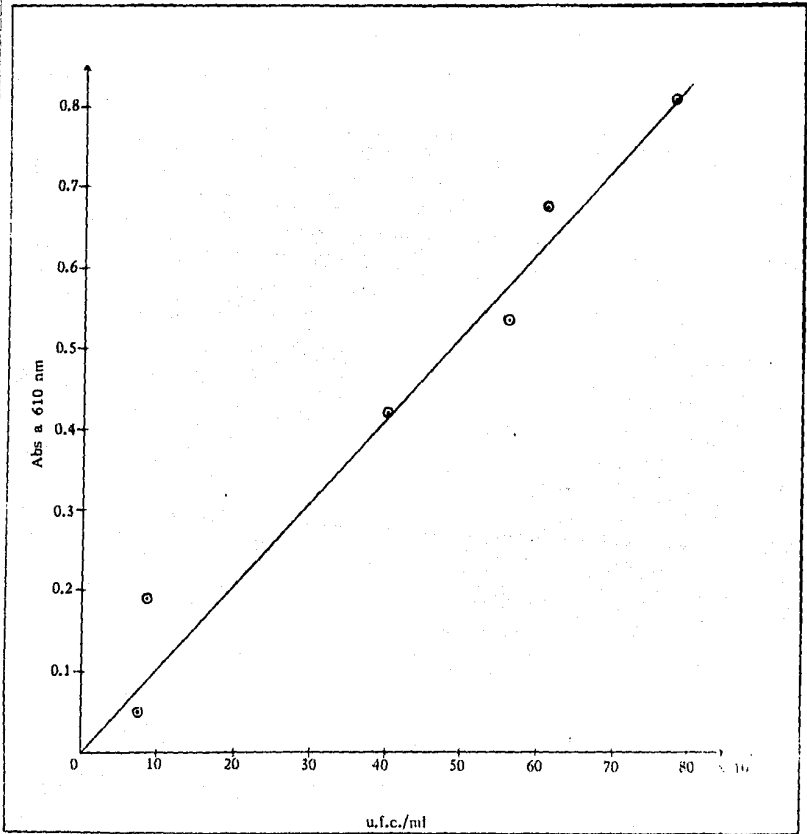
C U A D R O 4. 3.

Curva Estándar.

u.f.c./ml	Absorbancia (610 nm)
0	0
7.65×10^7	0.05
8.5×10^7	0.19
40×10^7	0.42
56×10^7	0.54
61×10^7	0.675
78×10^7	0.81

Corr. = 0.98862

Curva Estándar.



De acuerdo a los experimentos realizados y mostrados ya en las figuras 4.1 a 4.12. se constató la necesidad de obtener 2 factores finales para transformar las absorbancias en u.f.c./ml ya que el primer incremento sensible de absorbancia se presentó tanto a 6 como a 7 horas de incubación.

Para obtener el tercer parámetro matemático necesario para completar el desarrollo de la ecuación que aquí se estudia, se llevó a cabo una segunda curva estándar cuyos componentes se detallan a continuación:

$$\ln A_0 = \ln A_1 - kt_1 - R$$

t = 6 horas

k = 2.4502205

R = 11.887539

t = 7 horas

k = 2.4502205

R = 11.887539

Ao	u.f.c./ml
2.99888×10^{-4}	1550
2.99888×10^{-4}	1700
8.99664×10^{-4}	4400

Corr. = 0.99890611

m = 2.156629×10^{-7}

Ao	u.f.c./ml
5.1745417×10^{-5}	900
6.2094501×10^{-5}	900
1.65584×10^{-4}	2400
2.328525×10^{-4}	3100
1.0349038×10^{-4}	1100
4.1396334×10^{-5}	540

Corr. = 0.98448586

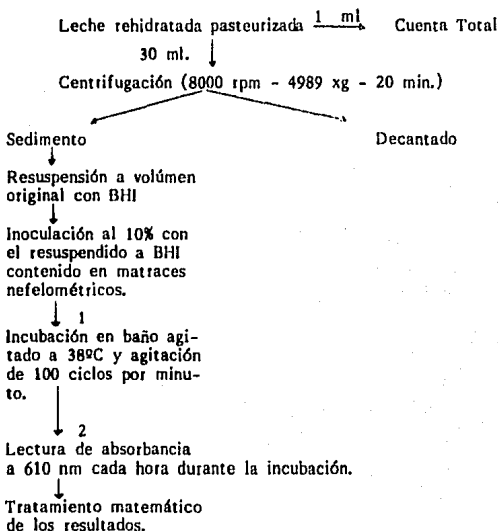
m = 7.323931×10^{-8}

Por último, se procedió a sustituir los valores de las variables involucradas en la ecuación (6') para así obtener los factores necesarios, dando como resultado lo siguiente:

$$\text{u.f.c./ml} = A_x (2.7810805 \times 10^5) \quad \dots \dots \dots (7)$$

$$\text{u.f.c./ml} = A_y (7.0651739 \times 10^4) \quad \dots \dots \dots (8)$$

IV. El diagrama del proceso seguido en las determinaciones de éste trabajo se muestra a continuación:



Para llevar a cabo la determinación de los parámetros de crecimiento, se efectuó análisis bacteriológico de Cuenta Estándar en el punto 1 y cada hora en la fase exponencial del crecimiento microbiano en el punto 2 .

La temperatura de incubación se seleccionó en base a la bibliografía disponible (27) y la velocidad de agitación de acuerdo a

las características del aparato utilizado.

Los resultados obtenidos en los diferentes experimentos realizados se presentan en el Cuadro 4.4.

La exactitud se conoce como la relación existente entre un dato experimental y otro real o de referencia; en este caso se consideró como dato experimental el obtenido al aplicar las fórmulas aquí desarrolladas y el de referencia o real el resultado originado por el método oficial.

Con las consideraciones anteriores, la fórmula utilizada y su resultado promedio fueron:

$$\text{Exactitud} = \frac{\text{Resultado por cálculo}}{\text{Resultado por el método oficial}} \times 100$$

$$\text{Exactitud} = 83.828423 \%$$

Para el cálculo estadístico de la *t* de Student según la hipótesis descrita en el Capítulo anterior se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$t = \frac{\bar{X}_2 - \bar{X}_1}{S_1^2/n_1 + S_2^2/n_2}$$

$$G.L. = (n+1) \left[1 + \frac{2}{(S_1^2/S_2^2) + (S_2^2/S_1^2)} \right] - 2$$

siendo $n = 2$, pues las determinaciones se hicieron por duplicado, S_1 y \bar{X}_1 los datos estadísticos de desviación estándar y media de los datos obtenidos por fórmulas, y, S_2 y \bar{X}_2 los mismos parámetros estadísticos para los resultados por el método oficial. Los resultados

obtenidos se muestran en el Cuadro 4.5.

Si la hipótesis establecía que para considerar válido el método propuesto el valor de la *t* calculada debía ser menor o igual al valor reportado en tablas puede entonces decirse, de acuerdo a los resultados mostrados en el Cuadro anterior, que el método es estadísticamente aceptable.

V. Evaluación económica de los métodos en estudio.

Concepto	Mét. Turbidimétrico	Mét. oficial
Costo por reactivo \$/det.	407.49	49.2
Costo por sueldo \$/det. *	866.66	1733.32
Costo Total	1274.15	1782.52
Tiempo necesario hr./det.	8	48

* El costo por sueldo se estableció suponiendo el tiempo gastado por un químico en efectuar 10 determinaciones, percibiendo un sueldo de \$260,000.00 por mes.

Todos los costos y estimaciones se hicieron en base a 10 análisis.

Debe considerarse también que el método turbidimétrico implica una inversión aproximada de \$24,000,000.00 por concepto de equipo (centrifuga refrigerada de velocidad intermedia), el cual sin embargo puede también utilizarse en otro tipo de análisis.

C U A D R O 4. 4.

Resultados de cuentas microbianas por el método turbidimétrico y oficial en muestras de leche.

Experimento No.	Tiempo (hrs.)	A ₁	u.f.c./ml (met. oficial)	u.f.c./ml (fórmula)
1	6	0.002	750	556.2161
2	7	0.01	900	706.51174
3	7	0.012	900	847.81409
4	6	0.015	4400	4171.6208
5	7	0.032	2400	2260.8376
6	7	0.045	3100	3179.3028
7	7	0.015	1900	1059.7676
8	6	0.005	1550	1390.5403
9	6	0.005	1700	1390.5403
10	7	0.021	1100	1483.6747
11	7	0.008	540	565.2093
12	6	0.015	6200	4171.6208

Corr. = 0.9471491

CUADRO 4.5.
RESULTADOS DEL CALCULO DE LA t DE STUDENT.

Absorbancia	u.f.c./ml por fórmula	u.f.c./ml por met. oficial	t calculada	G.L.	t_{05}	t_{99}
0.01 0.005	685.8494 342.9247 $\bar{x}_1 = 514.38$ $S_1 = 242.48$ CV = 47.13	800 1000 $\bar{x}_2 = 900$ $S_2 = 141.421$ CV = 15.71	1.942	1	12.706	63.657
0.012 0.013	823.0193 891.6042 $\bar{x}_1 = 857.31$ $S_1 = 48.49$ CV = 5.65	700 1100 $\bar{x}_2 = 900$ $S_2 = 282.84$ CV = 31.42	3.781	3	3.182	5.84
0.022 0.032	1508.8687 $\bar{x}_1 = 1851.79$ $S_1 = 484.96$ CV = 26.18	3000 $\bar{x}_2 = 2500$ $S_2 = 707.10$ CV = 28.26	1.886	3	3.182	5.84
0.045 0.022	3086.32 1508.86 $\bar{x}_1 = 2297.59$ $S_1 = 1115.42$ CV = 48.54	2000 3000 $\bar{x}_2 = 2500$ $S_2 = 707.10$ CV = 28.28	0.216	3	3.182	5.84
0.005 0.005	1456.06 1456.06 $\bar{x}_1 = 1456.06$ $S_1 = 0$ CV = 0	1600 1900 $\bar{x}_2 = 1750$ $S_2 = 212.13$ CV = 12.12	1.958	1	12.706	63.657
0.022 0.020	1508.86 1371.69 $\bar{x}_1 = 1440.28$ $S_1 = 96.99$ CV = 6.73	1000 $\bar{x}_2 = 1100$ $S_2 = 141.42$ CV = 12.85	2.806	3	3.182	5.84
0.01	685.84 $\bar{x}_1 = 617.26$ $S_1 = 96.99$ CV = 15.71	400 700 $\bar{x}_2 = 550$ $S_2 = 212.13$ CV = 38.56	0.407	2	4.303	9.925

$\bar{x}_1 = 2676.40$
 $S_1 = 389.36$
CV = 21.42

$\bar{x}_2 = 1457.14$
 $S_2 = 343.45$
CV = 23.89

DISCUSION DE RESULTADOS.

A continuación se analizan algunos aspectos de los resultados ya expuestos.

1.- Los resultados obtenidos con respecto a las condiciones de centrifugación se confirman con lo reportado en la literatura dónde se indica que es posible eliminar hasta un 99% de los microorganismos presentes en la leche por medio de fuerzas centrífugas altas (14).

2.- Aunque con un 5% de inóculo se registraron cambios apreciables de absorbancia en el tiempo requerido, la cuenta microbiana fué relativamente alta en esas muestras por lo que se decidió utilizar el 10%. La razón para esta decisión fué primeramente el protegerse de encontrar una muestra con baja concentración microbiana y que por lo tanto no alcanzara a traspasar el umbral de sensibilidad del aparato en el tiempo requerido: (por lo general se detectan concentraciones superiores a 10^6 microorganismos), y en segunda porque al agregar dicha concentración, con un manejo adecuado de la muestra, la turbidez presentada por la misma no rebasó los límites de confiabilidad en las lecturas de absorbancia inicial (menor a 0.8).

El manejo adecuado de la muestra considera principalmente que al realizar el decantado después de la centrifugación se elimine al máximo la grasa separada.

3.- En el punto referente a la determinación de los parámetros de crecimiento se mencionó que la lectura de absorbancia más baja sería considerada como cero o blanco, dicha decisión se tomó considerando el hecho de que el mencionado descenso de absorbancia no obedecía a un descenso en la población microbiana como se demuestra

en el cuadro 4.6, sino muy probablemente a la disolución de algún o algunos componentes presentes en la muestra. Otro factor que podría explicar el fenómeno sería el que los microorganismos en las primeras horas consumen nutrientes pero por su número tan reducido no alcanza a producir cambios en la densidad óptica.

4.- El objeto de realizar la segunda curva estándar es el de obtener el parámetro que relaciona los factores cinéticos matemáticos con - las u.f.c./ml obtenidas por el método tradicional, dicho parámetro resulta ser la pendiente de la gráfica obtenida de dicha relación.

5.- De las 15 muestras analizadas se registraron tres resultados de cuentas microbianas mayores al promedio analizado con las que el resultado por el método aquí propuesto no concordó con el oficial pues el resultado obtenido por fórmula fue mucho menor al reportado por vaciado en placas (121,000 - 13,104; 26,450 - 4,368; 19,850 - 2,912). Una razón para estos resultados puede ser el hecho de que hubiera existido un error o mal manejo de las muestras al realizar el análisis por el método oficial, o que el método aquí propuesto no proporcionó el resultado correcto, esto último conduce a pensar que es necesario examinar leches con diferentes rangos de contaminación por determinar entonces el origen real del error.

6.- Con respecto al análisis económico es importante destacar que al tomar en cuenta el procesamiento de 10 muestras, el costo es menor para el método propuesto que para el oficial; aunque la inversión inicial es mayor en el turbidimétrico, sobre todo si el laboratorio en cuestión no cuenta con dichos instrumentos para análisis fisicoquímicos;

por otro lado se debe tomar en cuenta que el equipo involucrado tiene una larga vida útil si se maneja y mantiene adecuadamente, además el poder detectar a tiempo problemas de contaminación podría en un momento dado evitar pérdidas mayores o en su defecto advertir al consumidor del problemas para entonces remediarlo oportunamente. Otra ventaja del método es poder detectar oportunamente el origen de una contaminación (pasteurizador, silo, etc.) y evitar así que la fuente siga produciendo daños.

C U A D R O 4. 6.

Seguimiento de una cinética microbiana durante la incubación.

Tiempo (hrs.)	Absorbancia (610 nm)	u.f.c./ml (met. oficial)
0	0.50	2450
1	0.39	4100
3	0.38	13550
4	0.38	35850
6	0.37	215000
7	0.38	1355000
8	0.475	7300000

Figura 4.1.
Experimento No. 1

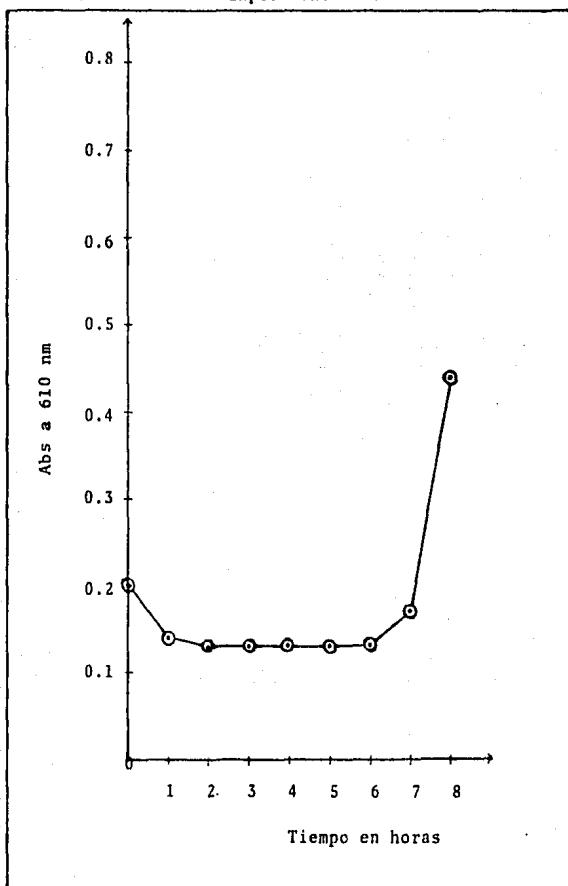


Figura 4.2.
Experimento No. 2

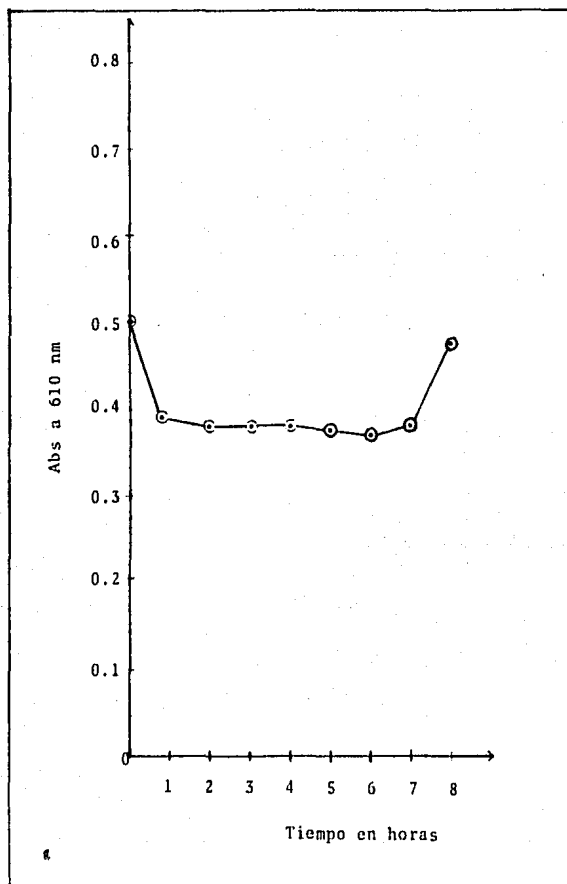
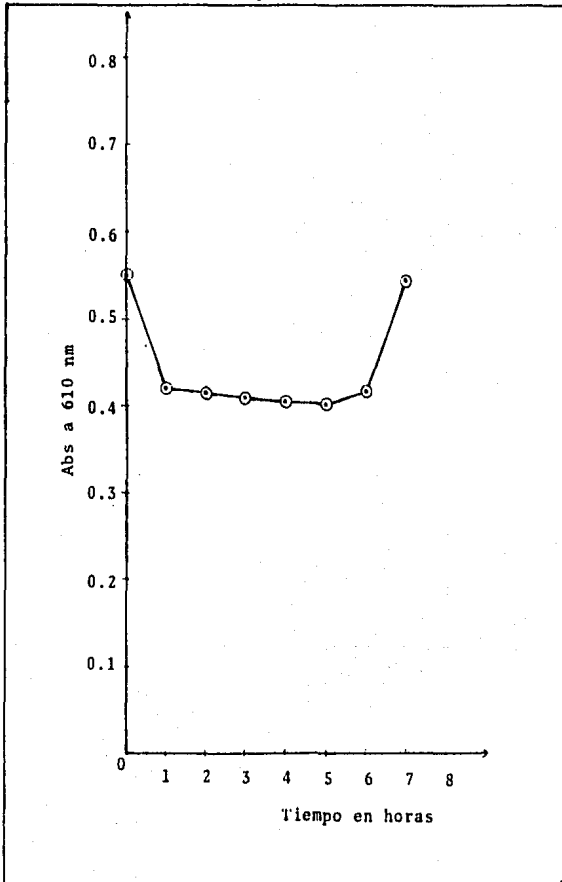


Figura 4.3.
Experimento No. 3



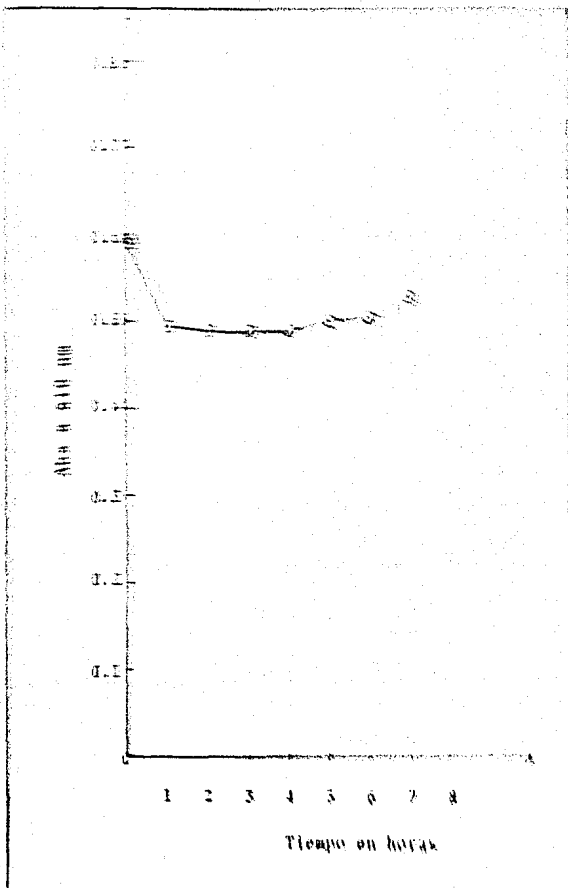


Figura 4.5.
Experimento No. 5

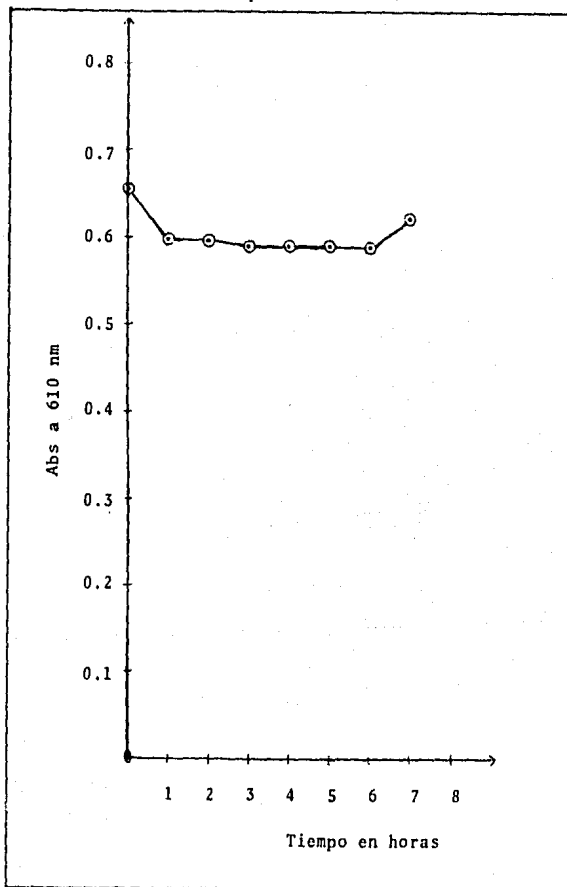


Figura 4.6.
Experimento No. 6

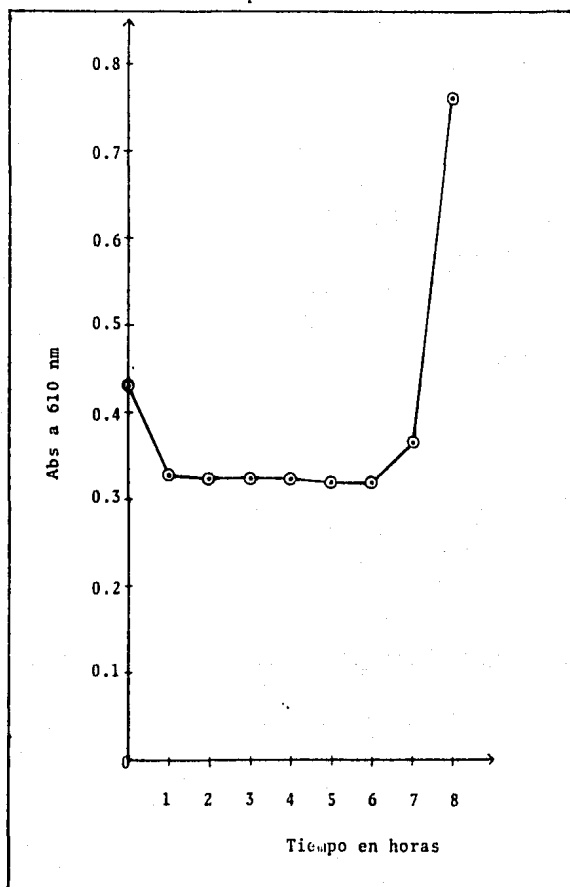


Figura 4.7.
Experimento No. 7

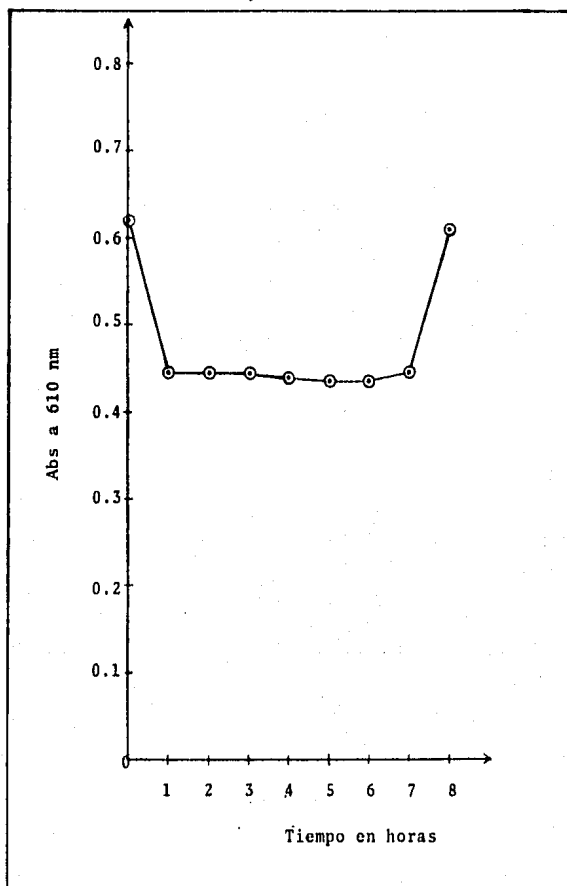


Figura 4. 8.
Experimento No. 8

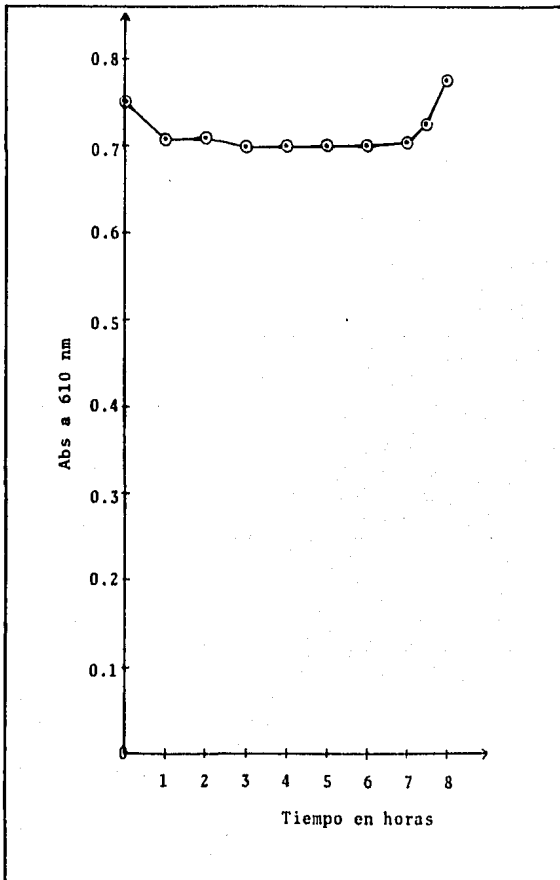


Figura 4.9.
Experimento No. 9

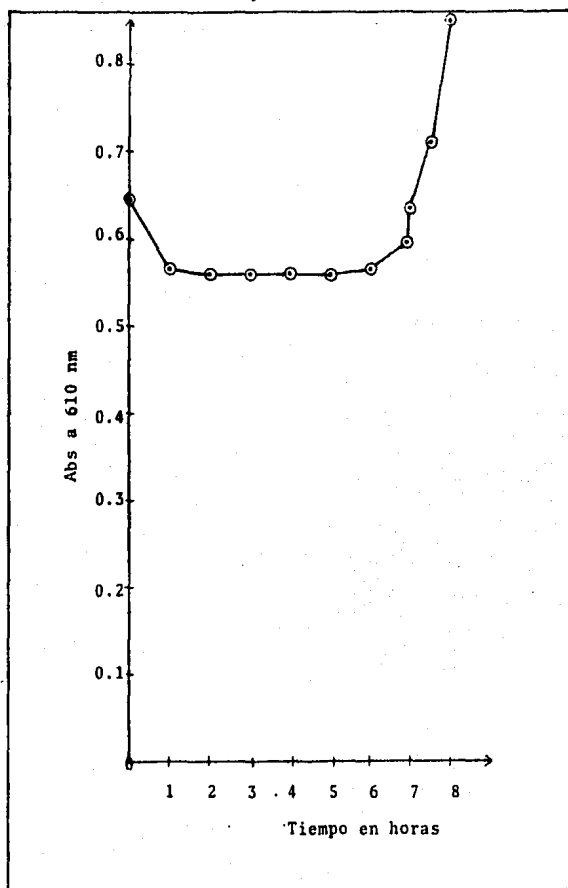


Figura 4.10.
Experimento No. 10

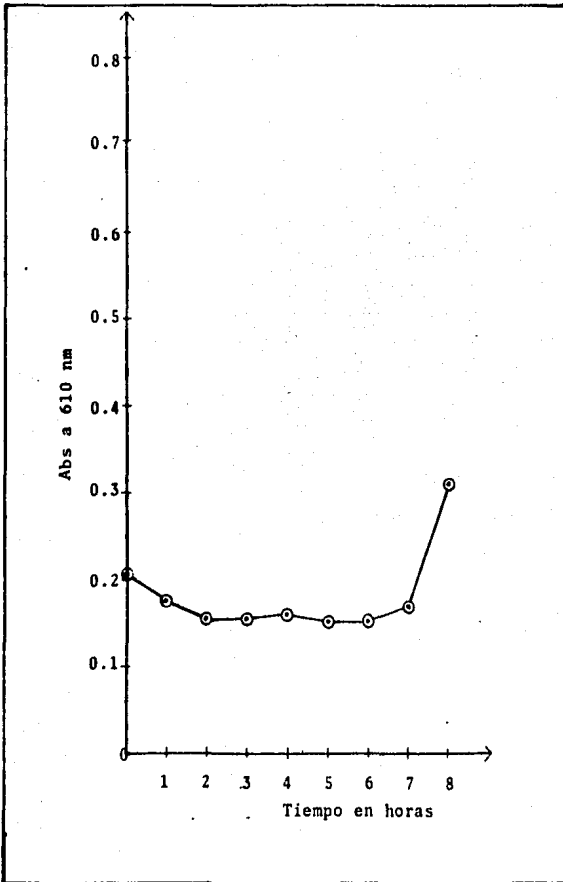


Figura 4.11.
Experimento No. 11

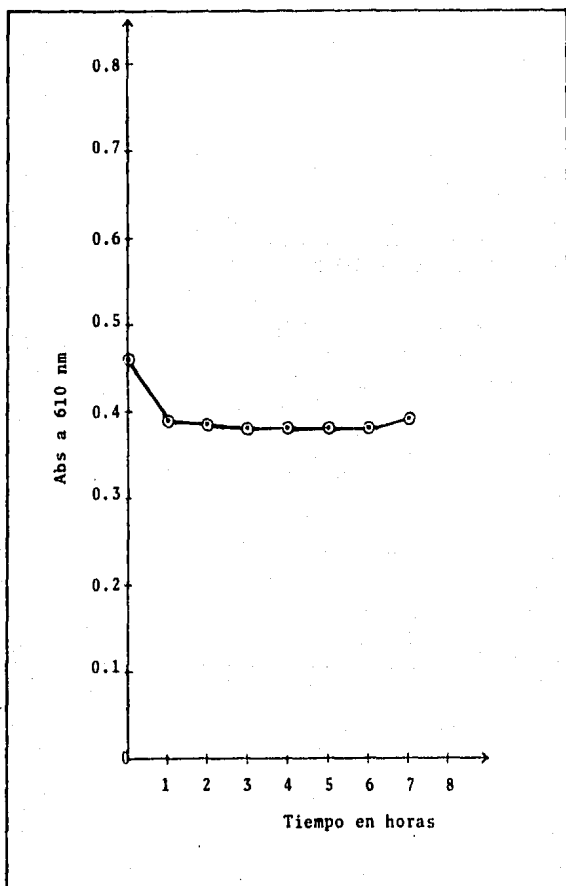
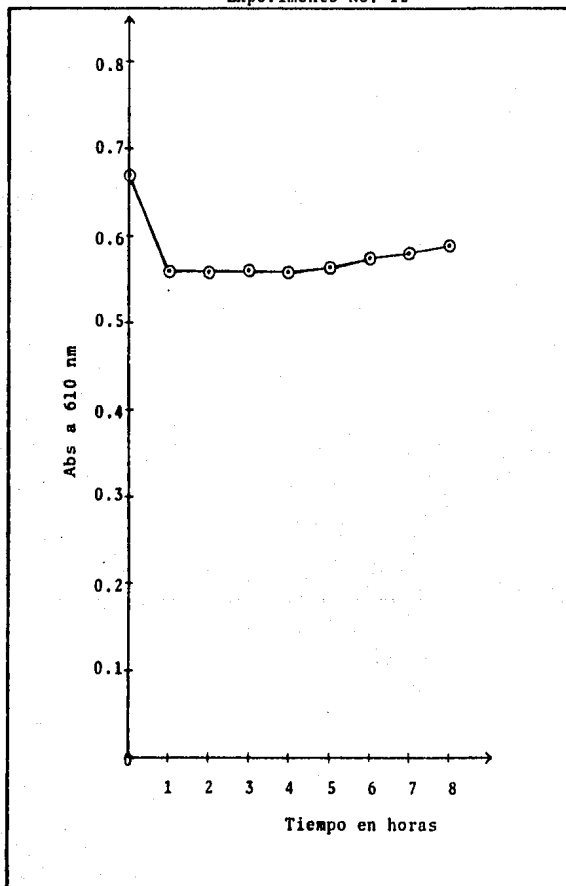


Figura 4.12.
Experimento No. 12



CONCLUSIONES
Y
RECOMENDACIONES.

Con base en los resultados reportados en el Capítulo anterior se concluye lo siguiente:

1.- Metodológica y estadísticamente se encontró que el método aquí propuesto si es aplicable al tipo de leche estudiada en los rangos analizados. Es posible aplicar este método a otro tipo de leches mediante el estudio de los parámetros cinéticos del sistema microbiano en cuestión. Se recomienda realizar experimentos con leches que contengan un índice mayor de contaminación a fin de establecer los límites de confiabilidad del método.

2.- Con los resultados obtenidos se puede decir que existe una buena correlación entre el método oficial y el método aquí propuesto, aunque esto es significativo, es importante señalar la necesidad de realizar un mayor número de experimentos a fin de contar con un conjunto más amplio de resultados que nos permita concluir de manera más contundente con respecto a su utilización práctica.

3.- Los parámetros cinéticos obtenidos en el presente estudio, son - bastante similares a los encontrados en un estudio anterior efectuado en el mismo tipo de leche, lo que indica que el sistema no ha variado considerablemente en cuanto a su comportamiento y características fisiológicas (27).

4.- Se sugiere realizar revisiones periódicas de los parámetros k , R y los derivados a fin de tener siempre la seguridad de estar trabajando bajo condiciones reales y confiables. Estas revisiones deberán realizarse sobre todo cuando se presente algún cambio en el proceso que pueda afectar la naturaleza del sistema microbiano, por ejemplo, cuando se realice un cambio en las materias primas utilizadas, en el proceso, envase, etc.

5.- Se recomienda probar diferentes caldos de cultivo con el fin de establecer el medio óptimo que genere la respuesta más sensible.

6.- El manejo de la muestra debe ser, como en todo método analítico y sobre todo microbiológico, sumamente cuidadoso. En este caso, en lo que se refiere a la eliminación de la grasa ya que ésta afecta negativamente a las lecturas de absorbancia.

7.- En cuanto a manejo y rapidez de ejecución el método turbidimétrico es mejor que el oficial, esto ayudaría a verificar oportunamente las condiciones del proceso de elaboración y manejo del producto y por lo tanto los estándares de calidad.

8.- Desde el punto de vista económico el método oficial implica un costo menor comparándolo con el aquí propuesto. Sin embargo, considerando que toda industria tiene también laboratorio de análisis físico-químicos, en el caso de contar con centrifuga y espectrofotómetro adecuado el método estudiado resulta más económico.

9.- Se considera conveniente estudiar la aplicación alternativa del método estudiado a nivel industrial, ya que aún a concentraciones microbianas bajas como las encontradas en este estudio, dicho método fue capaz de detectarlas.

BIBLIOGRAFIA.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 1.- Alais, Charles. Ciencia de la Leche. Cia. Edit. Continental, S.A. México. 1961.
- 2.- American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 13th. ed. American Public Health Association. Washington, D.C. 1972.
- 3.- Announcement. 1980. Food Technology. 34 (5): 149.
- 4.- Badui, Salvador. Química de los Alimentos. 1a. ed. Edit. Alhambra Mexicana, S. A., México. 1982.
- 5.- Blankenagel, G., 1976. An Examination of Methods to Assess Post Pasteurization Contamination. J. Food Milk Technol. 39 (4): 301-304.
- 6.- Boyko, A. and Blankenagel, G., 1966. Detection of Contamination in Pasteurized Milk. Can. Dairy Ice Cream Journal. 45 (6): 20.
- 7.- Cady, P. et. al., 1978. Automated Impedance Measurements for Rapid Screening of Milk Microbial Content. J. Food Prot. 41 (4): 277-283.
- 8.- Casas, I.A.; Leon, N. ; Izquierdo, P., 1977. Microtiter Technique for Enumeration of Mesophiles, Psychrotrophs and Coliforms in Raw and Pasteurized Milk. J. Food Prot. 40(11): 795-797.
- 9.- Reyes, Pedro. Bioestadística Aplicada. 1a. ed. Edit. Limusa, México. 1986.
- 10.- Donnelly, C.B. et. al., 1976. Spiral Plate Count Method for the Examination of Raw and Pasteurized Milk. Applied and Environmental Microbiology. 32(1): 21-27.
- 11.- Firstenberg-Eden, R. and Tricarico, M.K., 1984. Impedimetric Determination of Total, Mesophilic and Psychrotrophic Counts in Raw Milk. J. Food Science. 48(6): 1750-1754.

- 12.- Fung, Daniel Y.C. et. al., 1976. A Collaborative Study of the Microtiter Count Method for viable Cell Count of Raw Milk. *J. Milk Food Technol.* 39 (1) : 24-26.
- 13.- Keating, Patrick F. y Gaona, Hcmero. Introducción a la Lactología 1a. ed. Edit Limusa., México. 1986.
- 14.- Kessler, H.G. Food Engineering and Dairy Technology. 1a. ed. Published by Verlag a. Kessler., Germany. 1981.
- 15.- Leche Pasteurizada Preferente Extra. Norma Oficial Mexicana, NOM-F-447-1984. Dirección General de Normas. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. México. 1984.
- 16.- Leche Pasteurizada Preferente. Norma Oficial Mexicana, NOM-F-446-1984. Dirección General de Normas. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. México. 1984.
- 17.- Leche Reconstituida. Manuel de Control de Calidad. Libro de Fórmulas. Leche Industrializada Conasupo, S.A., México. 1983.
- 18.- Maxcy, R.B. 1967. A Rapid Test for Determining Post Pasteurization Contamination of Market Milk. *J. Dairy Science.* 50 : 938.
- 19.- News Notes Laboratory Instrumentation. 1980. *Food Technology.* 34 (12) : 46.
- 20.- Oliveira, J.S. and Parmelee, L.E. 1976. Rapid Enumeration of Psychrotrophic Bacteria in Raw and Pasteurized Milk, *J. Milk Food Technol.* 39 (4) : 269-272.
- 21.- Peeler, J. et. al. 1977. A Collaborative Study of the Spiral Plate Method for Examining Milk Samples. *J. Food Prot.* 40 (7) : 462-464.
- 22.- Peiczar, M. J. et. al. Microbiología. 2a. ed. Edit. McGraw Hill de México, S. A., México. 1982.
- 23.- Perry, John H. Chemical Engineer's Handbook. 3rd. ed. Edit. McGraw-Hill, New York. 1950.

- 24.- Potter, Norman. La Ciencia de los Alimentos. 2a. ed. EDUTEX, S.A. México. 1973.
- 25.- Punch, J.D. and Olson Jr., J.C. 1964. Comparison between Standard Method's Procedure and a Surface Plate Method for Estimating Psychrophilic Bacteria in Milk Food Technol. 27:43.
- 26.- Técnicas Generales para Análisis Microbiano de Alimentos. Secretaría de Salubridad y Asistencia. México. 1979.
- 27.- Toro, J.F. 1982. Utilización de Parámetros de la Curva de Crecimiento Bacteriano en la Evaluación de la Carga Microbiana en Leche Procesada. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N. México. 1982.
- 28.- Del Valle. Ma. del Carmen. 1984. La Leche y su Industrialización. Ciencia y Desarrollo. X (58) : 29-38.
- 29.- Wachter, M.C. y Owens J.D. 1986. Fuentes de los Cambios de Conductividad en un Método para la Enumeración Rápida de Microorganismos. Tecnología de Alimentos. 21 (3) : 7.
- 30.- Wood, J.M. and Gibbs, P.A. 1982. New Developments in the Rapid Estimation of Microbial Population in Foods. Developments in Food Microbiology. 1 : 138-214.