CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE

Prof. Dr. D. GUILLERMO SUÁREZ FERNÁNDEZ

Mi maestro, Catedrático de Microbiología e Inmunología en la Facultad de Veterinaria de León, fundador de los Laboratorios Ovejero de Productos Biológicos, Sueros y Vacunas sentía una debilidad por la Lactología, quizás porque en sus inicios trabajó en Liebefeld, Suiza, con el insigne Burri.

Fue miembro del Comité Nacional Lechero y Presidente; Miembro activo de la F.I.L.; perteneció a diversas Comisiones de trabajo en la Organización Internacional en la que yo colaboré. Recuerdo, allá por la década de los 70, la norma de recuento de coliformes en la leche, a la que contribuimos con otros laboratorios y que, recientemente, ha sido modificada.

Como alumno, seguimos sus pasos y al tiempo que en la década de los 60 obteníamos por Oposición la plaza de Profesor Adjunto de Microbiología e Inmunología éramos responsables de Control de Calidad para España en la primera Multinacional para alimentos manufacturados Kraftco Cº.

La Facultad satisfacía mi vocación con 1.500 ptas. de sueldo mensual y Kraft me proporcionaba el sustento familiar y allí aprendí muchas cosas interesantes.

Luego, cuando en 1971 obtuve la Cátedra de Microbiología e Inmunología de Zaragoza, escogí la dedicación exclusiva y seguí otros derroteros hacia la Patología Infecciosa, Enfermedades Transmisibles al hombre y estudios de carácter básico, pero sin olvidar del todo la Microbiología de los Alimentos.

Todavía hoy sigo perteneciendo al Comité Nacional Lechero, en calidad de Vocal, y al grupo de trabajo para bacterias grampositivas en la F.I.L. en donde hemos contribuido a las normas de detección de *L. Monocytogenes.*

No obstante, tengo que confesaros que la Lactología no es para nuestro grupo de trabajo en la Facultad de Madrid una tarea principal, aunque espero contribuir a la tarea que me encomienda la Real Academia Sevillana de Ciencias Veterinarias de la que soy miembro, a gran honra, y a la que me siento muy ligado por lazos de afecto y simpatía.

La leche como producto natural obtenido con higiene es un alimento sano y bastante completo en su composición, aunque algo escaso en hierro, adecuado

para la alimentación de la infancia, de enfermos y ancianos, al que se refirió el Pontífice Pío XI en el Congreso Internacional de Lechería de Roma en 1934 con las siguientes palabras:

> "*La leche es uno de los productos más maravillosos de la naturaleza y uno de los más preciosos que la mano de Dios, a través de las fuerzas naturales, pone a disposición del hombre para su bienestar*".

Antes de estas inspiradas palabras, en el Congreso de Lechería de Budapest de 1909 se había acordado la siguiente definición: "*La leche es el producto integral del ordeño completo y continuado de las reses lecheras sanas, bien alimentadas y limpias, sometidas a un régimen apropiado y no cansadas. Debe ser recogida con limpieza y no contener calostros*".

En el aspecto físico-químico la leche también ha sido definida y, para nosotros, la definición más adecuada es la de Lecoq cuando dice: "*La leche es una emulsión natural perfecta, en la cual, los glóbulos grasos están mantenidos en suspensión en un líquido salinoazucarado, gracias a la presencia de sustancias proteicas y minerales en estado coloidal*".

Esta definición proporciona, a un tiempo, información sobre el estado físico y composición de la leche.

El Código Alimentario Español del 21 de Septiembre de 1967 en su Capitulo XV define a la leche en los siguientes términos: "*Se entiende por leche natural el producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostros, del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras mamíferas domésticas sanas y bien alimentadas*".

Como puede apreciarse, la definición anterior está inspirada en la del Congreso Nacional de Lechería de Budapest.

Con la denominación genérica de leche se comprende única y exclusivamente la leche natural de vaca. Las leches producidas por otras hembras de animales domésticos se designarán indicando además el nombre de la especie correspondiente, de oveja, de cabra, de burra, de yegua, de camella y de búfala, que son todas las especies lactantes en la práctica.

En consonancia con la condición del tratamiento que se aplique a las leches naturales se denominan a su vez, higienizadas, certificadas, concentradas, desnatadas, fermentadas o acidificadas, enriquecidas, adicionadas de aromas y/o estimulantes, esterilizadas, evaporadas, condensadas y en polvo.

Diferentes tratamientos tecnológicos dan lugar a una serie de lactoderivados en los que se distinguen los siguientes grupos: Nata, Mantequilla, Queso, Suero lácteo, Caseína, Requesón y Helados.

CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA DE LA LECHE

Desde el punto de vista físico-químico la leche es un producto muy complejo, pero resulta necesario abordar el conocimiento de su estructura para comprender la dinámica de los procesos de transformación industrial y diferentes tratamientos aplicables al producto.

Elegimos la siguiente composición media(*) para la leche natural, expresada en porcentajes:

Lactosa	4,8
Grasa	3,7
Proteína	3,4
Nitrógeno (no proteico)	0,19
Sales (en forma de cenizas)	0,7
Agua	87,84

Los valores mínimos que señala nuestra legislación son los siguientes:

Lactosa	4,2
Grasa	3,0
Proteína	3,2
Cenizas	0,65
Extracto seco magro (mínimo)	8,2
Acidez	0,2 g en 100 ml.
Impurezas (máximo)	grado 1
Prueba de reductasa (azul de metileno)	más de 2 horas.

El color de la leche varía de blanco opaco al blanco amarillento y no se debe a pigmento alguno sino a la refracción de la luz por los glóbulos grasos emulsionados y micelas coloidales. El tono amarillento suele aparecer en primavera y verano, durante el pastoreo y se debe al consumo de hierba verde rica en carotenos.

La reacción normal de la leche recién ordeñada es de un pH 6,6, su punto de congelación es de -0,55 °C con relación al agua, lo que permite determinar

mediante crioscopia el fraude del aguado cuando el punto crioscópico es menor de -0,52°C [1] y el punto de ebullición a nivel del mar es de 101°C. A 80°C precipitan los carbonatos y la albúmina se coagula formando un velo superficial.

La densidad media de la leche es de 1,032 (1,028-1,034) y la tensión superficial de la leche entera es de 53 dinas/cm a 0°C y la de la leche desnatada es de 55-60 dinas/cm debido al efecto depresor de la grasa.

Considerando que el agua a 20°C tiene una viscosidad de 2 centipoise, la viscosidad de la leche entera es de 2,1 y la de la leche desnatada es 1,8. La viscosidad de la leche desnatada varía con la temperatura inversamente hasta los 62°C. A partir de esta temperatura se incrementa la viscosidad.

El fenómeno se debe a la hidratación de las proteínas que sigue una curva semejante.

La homogeneización de la leche aumenta su viscosidad debido a la absorción globular de las partículas en suspensión.

En la leche normal la conductividad eléctrica es de 0,005 Ohm^{-1} a 25°C. El aguado de la leche disminuye la conductividad pero esta constante es muy variable y su determinación no sirve como sistema único para descubrir el fraude. Los iones que contribuyen en mayor parte a la conductividad son los Na^+, K^+, Cl^-.

El índice de refracción de la leche a 20°C es de 1,34209 y el del agua 1,33299. No es un método apropiado para detectar el aguado pero se utiliza mucho en tecnología lechera para determinar el grado de concentración de la leche en los procesos de evaporación, ultrafiltración y ósmosis inversa. También se emplea en la fabricación de leche condensada.

MATERIAS O COMPONENTES DE LA LECHE

Lactosa

La lactosa es el principal constituyente sólido de la leche y la proporción varía entre un 4,2 y 5%, siendo más baja en la fase final de la lactación y en las hembras con mastitis.

La lactosa es un disacárido formado por dos moléculas de α–D-glucosa y β-D-galactosa. La lactosa es uno de los azúcares menos solubles, con una solubilidad acuosa de 17,8% a 25°C. Por encima de esta proporción cristaliza en productos como la leche concentrada, leche condensada azucarada, lácteos

1. La crioscopia permite detectar aguado a partir de un 3%.

congelados, dando una textura arenosa debida a la forma cristalina α hidratada en forma de "hacha de guerra india" por lo que es necesario inducir la cristalización con cristales diminutos que pasan desapercibidos al paladar.

La forma β tiene una solubilidad mayor pero por mutarrotación se alcanza un equilibrio de las dos formas.

La lactosa influye en la presión osmótica, descenso crioscópico e incremento del punto de ebullición.

Grasa

La grasa láctea tiene una composición compleja. Entre los componentes predominan los triglicéridos que forman el 98% de la grasa de la leche en la que se encuentran pequeñas cantidades de diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres. También existen cantidades apreciables de fosfolípidos, colesterol y cerebrósidos. Las vitaminas liposolubles A, D y E, junto a pequeñas cantidades de vitamina K y pigmentos carotenoides, aunque se encuentran en pequeñas cantidades, tienen un algo valor nutritivo de carácter cualitativo.

Proteínas

Las proteínas son polímeros de α-aminoácidos (así denominados porque el grupo amino NH_2 está fijado sobre el carbono ligado al grupo carboxílico).

Las proteínas son de 2 tipos, caseínas y proteínas del lactosuero. Las caseínas constituyen más del 80% de las proteínas totales de la leche, pero al final del período de lactación asciende la albúmina sérica. El período calostral es especialmente rico en lactoglobulina.

Las caseínas de la leche se pueden clasificar en 5 tipos: Alfa 1 y 2, Beta, Gamma y Kappa. El peso molecular oscila entre 23 y 25 kDa para Alfa y Beta, de 11 a 20 kDa para Gamma y 1.980 kDa para Kappa. Estas caseínas, con sus particularidades, están en forma de fosfocaseinato cálcico.

El carácter anfifílico de las caseínas y su fosforilización facilita las interacciones entre ellas y con el fosfato cálcico y así se forman las micelas coloidales, complejos esféricos altamente hidratados, de un tamaño de 30 a 300 nanómetros. El conocimiento de esta estructura micelar tiene una gran importancia práctica, ya que muchos de los tratamientos en tecnología lechera influyen en uno u otro sentido en la estabilidad de las caseínas.

Las proteínas del lactosuero son las albúminas y globulinas. Concretamente, la α-lactoalbúmina y la β-lactoglobulina que son proteínas nativas, la seroalbúmina y seroglobulina, de origen sanguíneo se encuentran en muy pequeñas cantidades a no ser en el periodo calostral.

Los pesos moleculares son de 14 kDa para la lactoalbúmina, 18 para la lactoglobulina, 63 kDa para la seroalbúmina y hasta 10^6 kDa para la inmunoglobulina.

Las micelas de caseína son notablemente estables a temperaturas de hasta 140ºC y las proteínas del suero son termolábiles y se desnaturalizan a los 80ºC.

Las proteínas lácteas tienen el más alto valor nutritivo y así se ha considerado por la Comisión de Agricultura y Alimentación de las Naciones Unidas. Los dos tipos de proteínas lácteas, caseínas y proteínas del suero, se complementan con respecto al contenido en aminoácidos esenciales y ello compensa la ligera deficiencia en metionina y cisteína de la caseína. La proteína láctea, además de su valor biológico elevado es muy digestible aunque la digestibilidad y pérdida de nutrientes puede disminuir con el procesado y transformación.

La leche contiene también una serie de componentes minoritarios y micronutrientes, en especial enzimas que superan las 50, y vitaminas, que en parte se pierden en la fabricación y almacenamiento.

Minerales

Los minerales más importantes en la leche son los bicarbonatos, cloruros y citratos de calcio, magnesio, potasio y sodio. Pueden encontrarse en la fase soluble como los iones monovalentes Na^+ y K^+ o en fase predominantemente coloidal, como el calcio y el fósforo, que sobrepasan el 55% en estado coloidal. Los citratos y fosfatos de calcio y magnesio entre las fases soluble y coloidal y sus interacciones con las proteínas lácteas juegan un importante papel en la estabilidad de la leche y los derivados lácteos.

La concentración de calcio iónico soluble, no micelar, es muy baja, de 6,6% aproximadamente.

La proporción de citrato en la leche está sometida a una variación estacional y en relación con la alimentación de la vaca y afecta al contenido de calcio soluble y a la estabilidad de la leche, porque al secuestrar al calcio reduce el disponible para unirse con la caseína y estabilizar las micelas evitando su agregación.

Los iones monovalentes, junto a la lactosa y otros componentes de bajo peso molecular mantienen la presión osmótica en un valor isotónico con el de la sangre.

Los cambios en la concentración de sales o de lactosa en la leche se compensan con cambios recíprocos en los otros componentes y la presión osmótica de la leche permanece constante dentro de estrechos límites y solamente se altera en casos de infección mamaria o de adulteración.

La leche es una importante fuente de calcio en la dieta y se considera que la asociación con las caseínas puede mejorar la absorción en el tracto intestinal. El calcio es un elemento indispensable en la juventud para un correcto desarrollo óseo y dentario y en los estados de menopausia en la mujer como prevención de la osteoporosis.

CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE

La calidad de la leche y los productos lácteos dependen en gran parte de su microbiología y en su valoración oficial actualmente se incluyen siempre normas microbiológicas.

El conocimiento microbiológico nos va a permitir prevenir e impedir la transmisión de bacterias patógenas al consumidor de productos lácteos, evitar o reducir la proliferación de bacterias en la leche y sus productos impidiendo su alteración y, finalmente, favorecer y dirigir el desarrollo de bacterias útiles en la fabricación de productos lácteos fermentados.

En primer lugar queremos afianzar una idea: la ubre raramente sufre una contaminación endógena salvo en caso de enfermedad orgánica, de tuberculosis o brucelosis, por ejemplo, la contaminación de la ubre se realiza a través del pezón y depende de la flora ambiental, de suelos, cama con paja, operaciones de ordeño, etc. Y de otra parte de la perfección con que actúa el esfínter de cierre, que parece ser un carácter genético. Así de sencillo.

No debe extrañarnos que existan vacas cuya leche en el momento del ordeño es casi estéril y vacas que contengan 1.000-10.000 o más microorganismos por ml.

Hay que admitir, sin embargo, que la leche, aún la ordeñada asépticamente y procedentes de reses sanas contiene microbios, hecho comprobado experimentalmente por Orla Jensen, Freundeureich y otros microbiólogos de primeros de siglo y repetidamente confirmado.

A este nivel cabe hacerse una pregunta: ¿es la microflora láctica una microflora especial? En cierta medida si, porque progresan y se multiplican

mejor en la leche los microorganismos fermentadores de lactosa, glucosa y galactosa, obteniendo así la energía para su proliferación en los conductos y senos galactóforos y parénquima glandular. No es infrecuente que en la misma mama unos cuarterones están más afectados que otros por la contaminación bacteriana.

Son bacterias cuyo "hábitat" natural es la leche, que se integran por tanto en la llamada microflora láctica los géneros *Streptococcus, Pediococcus, Corynebacterium, Micrococcus, Staphylococcus, Leuconostoc, Propionibaterium, Lactobacillus* y otra serie de bacterias ubicuitarias de los géneros *Bacillus, Clostridium, Pseudomonas, Flavobacterium, Alcaligenes, Escherichia, Salmonella, Shigella* y *Enterobacter*. Menos frecuentes son los géneros *Listeria* y *Yersina*, pero con especies muy peligrosas, como *L.monocytogenes* y *Y.enterocolytica*.

En un grupo determinado pueden existir gérmenes de aplicación industrial como *Srt.lactis, Str.cremoris, Lactobacillus bulgaricus*, por ejemplo, en tanto que *Str.agalactiae, Str.dysgalactiae* y *Str.uberis*, originan mastitis con inflamación parenquimatosa de la ubre.

Algunos de los géneros contienen especies que se integran en la flora psicotrofa o termorresistente con el significado que esto encierra desde el punto de vista de la transformación industrial.

Especialmente importante es el contenido en bacilos esporulados aerobios y anaerobios de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* en donde existen algunas especies y cepas o estirpes psicotrofas y la termorresistencia debida a la estructura del esporo es un hecho claro en todas las especies y estirpes de estos géneros.

Los esporos del género *Clostridium* causan serios defectos en la fabricación del queso de tipo Suizo, Emmental y Gruyère. Las bacterias esporuladas de los géneros *Bacillus* y *Colstridium* provienen del suelo, paja, heno y también del ensilado.

La vaca enferma puede originar contaminaciones endógenas no frecuentes de la mama, por vía sanguínea y linfática, como es el caso de *Brucella abortus, Mycobacterium tuberculosis, Coxiella burnetti, Salmonella enteritidis o S.dublin y L.monocytogenes*. El aire, el estiércol, la paja y ensilado, el ordeñador, el equipo lechero, son las principales fuentes de contaminación de la leche.

La leche es un buen medio de cultivo para los microorganismos pero tiene un carácter más bien selectivo y ésta es otra razón que justifica hablar de bacterias lácticas o habitualmente presentes en la leche.

En la leche natural son factores limitantes del crecimiento bacteriano (pero solamente por un breve espacio de tiempo) los siguientes:

1. Anticuerpos. La leche puede contener inmunoglobulinas frente a microorganismos potencialmente patógenos, en especial en el período calostral.
2. Fagocitosis. Con aumento de monocitos-macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (PMNs).
3. Lactoperodicasa / tiocianato / peróxido de hidrógeno. Poderoso antimicrobiano.
4. Lactoferrina. Compite con las bacterias por el hierro disponible.
5. Solamente las bacterias que tienen la enzima β-galactosidasa son capaces de hidrolizar la lactosa y utilizar los monosacáridos liberados, glucosa y galactosa. Por lo tanto, el desarrollo queda limitado para las bacterias carentes de la enzima, tal y como se indicó anteriormente. Algo parecido sucede con los aminoácidos que no se encuentran libres, si no es en muy pequeña cantidad y las bacterias desprovistas de proteasas se desarrollan con gran dificultad en la leche.
6. La leche es una buena fuente de minerales pero algunos como el hierro, el cobre, el zinc y el manganeso se encuentran en baja proporción. Se ha visto que el pobre contenido de la leche en hierro, unido a la acción de la lactoferrina captadora de hierro, restringe el crecimiento de las bacterias del género *Pseudomonas*, de gran ubicuidad y peligro para la salud pública en el caso de *Pseudomonas aeruginosa*.

BACTERIÓFAGOS Y OTROS VIRUS

La leche es una fuente de contaminación por fagos o virus bacterianos que pueden contaminar los cultivos lácticos de arranque o "starter" en la fermentación industrial.

La gran especificidad de los fagos por una determinada estirpe bacteriana exige la rotación de cultivos lácticos o el empleo de diferentes estirpes bacterianas. Aunque la pasterización destruye las bacterias no esporuladas. Los bacteriófagos de los estreptococos manifiestan una resistencia térmica elevada. En general la pasterización de la leche resulta insuficiente para destruir todos los bacteriófagos.

Los bacteriófagos son muy frecuentes en la industria lechera y constituyen el principal factor de inhibición de la actividad de los fermentos industriales.

MICOTOXINAS LÁCTEAS

Los metabolitos tóxicos producidos por hongos son muy variados en su composición química desde la estructura aromática simple a los complejos policíclicos y péptidos tóxicos.

Son importantes las ocratoxinas A y B, sterigmatocistina, patulina, ácido penicílico y aflatoxinas, que son las micotoxinas más importantes, con una potente actividad carcinogenética a nivel hepático.

Las aflatoxinas producidas por *A.flavus* y *A.parasiticus* son derivados cumarínicos que contienen el núcleo bifurano y configuración lactónica. Se conocen unas 20 aflatoxinas pero las realmente importantes son las B_1, B_2, G_1 y G_2. El aspecto a destacar ahora es la posibilidad de que se elimine por la leche en forma de hidroxiderivados de las aflatoxinas B_1 y B_2, con la denominación M_1 y M_2 hidroxiaflatoxina. El nivel de tolerancia máximo en la leche es de 0,05 ppb para la aflatoxina M_1.

LISTERIOSIS

Con el nombre de listeriosis se conocen una serie de procesos en los animales y en el hombre que se caracterizan por una iniciación febril y septicémica, en el curso de los cuales aparece alguno o varios de estos signos: hiperglucemia, mononucleosis (monocitosis), necrosis hepática de carácter focal, aborto, encefalitis, endocarditis y necrosis de miocardio, queratitis y mastitis. La listeriosis es producida de manera principal por *L.monocytogenes*.

Existe, claramente diferenciada, una fisionomía patológica por especies y así la moncitosis y hepatitis con necrosis focal son propias de los roedores, mientras que el aborto y las encefalitis se presentan en los rumiantes. En el hombre predominan también las formas encefalíticas o con sintomatología de meningitis cerebroespinal o parálisis bulbar y en la mujer gestante los abortos o infección neonatal, si bien la mayoría de las veces puede cursar de forma inaparente o con síntomas leves y pasar desapercibida.

La importancia de la listeriosis como problema sanitario se debe a diferentes brotes humanos que en las décadas de los ochenta y noventa surgieron con gran virulencia en Canadá, EE.UU., Suiza, Inglaterra y Francia, con una elevada mortalidad que sobrepasa el 30%.

A consecuencia de las medidas sanitarias adoptadas los focos de listeriosis humana han descendido de forma drástica.

ENTEROTOXINA ESTAFILOCOCICA

La intoxicación alimentaria por estafilococos aparece por primera vez en la historia científica descrita como un alarmante brote, en 1884, afectó a 30 individuos del Estado de Michigan (EE.UU.) por la ingestión de queso tipo Cheddar. Se observó la presencia de bacterias esféricas en el queso y se sugirió que éstas producían una sustancia química capaz de desencadenar el síndrome.

La enfermedad se diagnostica sucesivamente por Denys en 1894 en Bélgica, por Owen en 1907 en U.S.A. y por Barber en 1914 en Filipinas, debida ésta al consumo de leche natural.

Pero la primera demostración de la existencia de una toxina fue realizada por Dack y sus colaboradores, quienes en 1930 determinaron que el filtrado acelular de estafilococos dorados aislados de pasteles rellenos de crema, sospechosos de originar intoxicación, reproducía sorprendentemente los síntomas típicos de la intoxicación al ser inoculado a voluntarios humanos.

Las enterotoxinas son exoproteínas producidas por *Staphylococcus aureus*, bajo ciertas condiciones, en medios sintéticos y en alimentos, cuya ingestión determina la aparición de unos síntomas característicos. Poseen propiedades higroscópicas y son muy solubles en agua y en soluciones salinas. Tras la liofilización aparecen como una sustancia algodonosa y blanca.

Hasta el momento, por reacciones con antisueros específicos, se conocen 8, designadas correlativamente de la A a la F, si bien dentro de la C quedan encuadradas 3, diferenciadas por el punto isoeléctrico. No obstante, la mayoría de los investigadores opinan que el número de enterotoxinas aún no identificadas es más amplio.

La intoxicación por toxina estafilocócica, muy frecuente en los años 60 y 70 ha decrecido de forma considerable debido a la eficacia de la cadena de frío en la conservación de los alimentos.