



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

# Determinación de la calidad higiénica de la leche mediante la medición indirecta del tiempo de reducción del azul de metileno o prueba de la reductasa microbiana.

<b>Apellidos, nombre</b>	García Martínez, Eva (evgamar@tal.upv.es) Fuentes López, Ana (anfuelo@upvnet.upv.es) Fernández Segovia, Isabel (isferse1@tal.upv.es)
<b>Departamento</b>	Departamento de Tecnología de Alimentos
<b>Centro</b>	ETSIAMN. Universitat Politècnica de València



## 1 Resumen de las ideas clave

La calidad de la leche comercial y de sus derivados elaborados en una industria láctea, depende directamente de la calidad del producto original o materia prima, proveniente de las zonas de producción y de las condiciones de transporte, conservación y manipulación en general hasta la planta. La prueba de la reductasa bacteriana o medición del tiempo de decoloración del azul de metileno en leche se basa en que cuando se añade una pequeña cantidad de azul de metileno a la leche y la mezcla se incuba a 37°C, se produce una decoloración debida al metabolismo bacteriano. La velocidad a la que se produce el cambio de color es directamente proporcional al número de gérmenes presentes. De esta manera se puede determinar de manera indirecta la calidad higiénica de la leche.

En este artículo se describe el fundamento de la determinación de la prueba de la reductasa bacteriana en leche. También se explica cómo interpretar los resultados en términos de crecimiento microbiano y calidad higiénica de la leche.

## 2 Introducción

Según del Código Alimentario Español, 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 de mamíferos domésticos, sanas y bien alimentadas. Incluye única y exclusivamente la leche natural de vaca, ya que las leches producidas por otras hembras de animales domésticos se designarán indicando el nombre de la especie correspondiente: leche de oveja, leche de cabra, leche de burra, leche de yegua y leche de camella.

La leche constituye un alimento fundamental y básico en la alimentación humana. Puesto que la leche sufre diferentes transformaciones industriales para su venta al consumidor (leche tratada térmicamente pasteurizada, esterilizada o UHT) o bien para la elaboración de productos lácteos, el control de calidad desde su origen es fundamental para obtener productos que cumplan las exigencias legales de calidad y que satisfagan las expectativas de los consumidores desde el punto de vista bromatológico.

Los criterios y requisitos relativos a la manipulación higiénica e inspección de la leche y derivados lácteos con el objetivo de garantizar la seguridad alimentaria, por los productores del sector primario así como a las industrias de transformación, quedan recogidos en los Reglamentos (CE) 853/2004 y 854/2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal y por el que se establecen las normas específicas para la organización de los controles oficiales de los productos de origen animal, respectivamente y Reglamento (CE) 1663/2006 para la Leche cruda, calostro, productos lácteos y productos derivados del calostro.

En el presente artículo docente se detalla uno de los procedimientos indicadores de la actividad microbiológica a tener en cuenta en el control de calidad de la leche en el laboratorio antes de llevar a cabo la transformación y con posterioridad a los procesos de tratamiento térmico para comprobar la eficacia de los mismos.



### 3 Objetivos

Con este artículo docente se persigue que los alumnos adquieran la capacidad de:

- Comprender los fundamentos de la medida del tiempo de reducción del azul de metileno o prueba de la reductasa bacteriana en una muestra de leche.
- Aplicar el procedimiento experimental de la prueba de la reductasa bacteriana en el laboratorio.
- Interpretar los resultados obtenidos y relacionarlos con la presencia de microorganismos y la calidad higiénica de la leche.

### 4 Desarrollo

A continuación pasamos a describir el fundamento de la medida del tiempo de reducción del azul de metileno en una muestra de leche y su aplicación en el control de calidad higiénico en la industria láctea. Después, se describirá el procedimiento experimental y la interpretación de los resultados.

#### 4.1 Fundamento del método

La mayoría de los gérmenes de la leche cuando se multiplican elaboran enzimas reductasas que modifican el potencial de óxido-reducción de la misma. Para demostrar ese fenómeno basta añadir a la leche una sustancia que se decolore al pasar de la forma oxidada a la forma reducida. La rapidez con que cambia de color está en función de la población bacteriana y, por ello, puede ser un índice del grado de contaminación de la leche. El colorante más empleado en la industria láctea para realizar esta prueba es el azul de metileno, pero también se pueden utilizar la resazurina y el cloruro de 2, 3, 5, trifeníl-tetrazolium, ya que son colorantes fácilmente absorbibles por las células vivas y se decoloran a una velocidad proporcional a la actividad de las reductasas microbianas.

En general se admite que la decoloración es más rápida cuanto mayor es el número de microorganismos en la leche. Sin embargo, algunas especies de microorganismos reducen el potencial de óxido-reducción mucho más rápidamente que otras. Así el *Streptococcus liquefaciens*, los gérmenes del grupo coliaerógenos y los de la putrefacción (*Bacillus subtilis*) se muestran muy activos. Por lo tanto la prueba de reducción no se puede considerar como una prueba exacta para valorar el número de bacterias realmente presentes pero en la práctica resulta de gran utilidad.

Existen otros factores que pueden afectar al tiempo de reducción, entre ellos, además del tipo de microorganismo, el número de células somáticas o leucocitos, el periodo de exposición a la luz y la cantidad de oxígeno disuelto. En este sentido, a medida que aumenta el número de leucocitos en la leche y su exposición a la luz, el tiempo de reducción tiende a reducirse, mientras que la agitación (al aumentar la cantidad de oxígeno disuelto) es un factor que tienden a retardar el tiempo de reducción. En la leche se estudia la actividad de la enzima reductasa generada por



los microorganismos presentes y cuya actividad aumenta a medida que éstos aumentan, y la enzima aldehído-reductasa componente de la leche, cuya actividad se utiliza para controlar el tratamiento térmico (pasteurización, esterilización) a que se ha sometido la leche. Por estos motivos esta prueba sirve para controlar tanto el estado higiénico, como el tratamiento térmico y la conservación de la leche.

## 4.2 Material y Reactivos

### Material e Instrumentación

- Baño María termorregulador o estufa a 37°C
- Pipetas graduadas (estériles)
- Tubos de ensayo con tapones estériles
- Cronómetro

### Reactivos

- Solución de azul de metileno al 1% en metanol.

## 4.3 Procedimiento

1. Agitar la leche y agregar 10 ml de leche a un tubo de ensayo. Realizar dos ensayos simultáneos para cada muestra de leche.
2. Añadir 0,5 ml de la solución de azul de metileno en cada tubo, evitando el contacto con la leche (Figura 1).

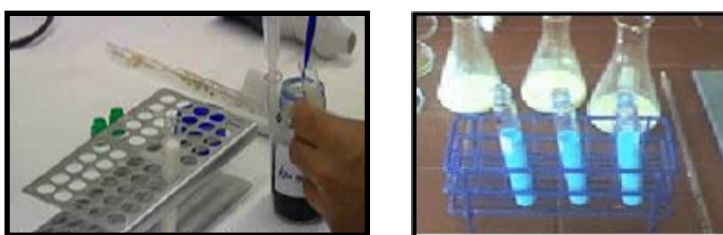


Figura 1. Adición del indicador azul de metileno a cada tubo de leche.

3. Una vez preparados los tubos, taparlos e introducirlos en baño maría a 37°C junto con un tubo patrón (leche sin indicador azul de metileno) (Figura 2). Cuando la temperatura de la muestra alcance 37° mezclar el contenido de los tubos por inversión para obtener una perfecta homogeneización del colorante y la leche. Tapar el baño maría para mantener los tubos al abrigo de la luz.



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



*Figura 2. Muestra de leche con el indicador azul de metileno en baño maría*

4. Comenzar a contar el tiempo de reducción (decoloración) en el momento en que se invierten los tubos y observar su color frecuentemente, sin agitarlos (Figura 3).



*Figura 3. Observación del color de las muestra de leche con la solución de azul de metileno.*

5. Leer los resultados cada 15 minutos durante 7 horas, anotando el porcentaje de decoloración y el tiempo que tarda en ser decolorado el azul de metileno (Figura 4).



*Figura 4. Tubo de leche con indicador azul de metileno a tiempo 0 (izquierda) y tubo de leche con indicador azul de metileno al cabo de 7 horas de incubación (derecha).*



## 4.4 Interpretación de los resultados

La presencia de microorganismos en la leche y por su acción reductora, se produce una modificación del color del azul de metileno, pasando de color azul intenso a azul claro, pudiendo desaparecer totalmente de acuerdo a la carga microbiana presente. Una leche con un contenido bajo en microorganismos, no modifica el tinte azul del colorante o tarda mucho tiempo en modificarlo. Se pueden calcular aproximadamente los resultados de la prueba del azul de metileno según la Tabla 1.

Calidad de la leche	Tiempo de decoloración	Número estimado de bacterias por ml
Buena	5 horas	100.000 a 200.000
Regular a buena	2-4 horas	200.000 a 2.000.000
Mala	≤ 2 horas	2-10 millones

*Tabla 1. Clasificación de la calidad de la leche en función del tiempo de decoloración del azul de metileno.*

## 5 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje se ha descrito el método para la realización de la prueba de la decoloración del colorante azul de metileno o prueba de la reductasa bacteriana. Esta prueba resulta muy útil a la hora en la industria láctea puesto que la velocidad a la que se produce el cambio de color del indicador azul de metileno es directamente proporcional al número de gérmenes presentes. De esta manera se puede determinar de manera indirecta la calidad higiénica de la leche.

## 6 Bibliografía

[1] Boletín Oficial de Estado (BOE). Disponible en: <http://www.boe.es/>.

[2] Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DO). Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/es/index.htm>.

[3] Normas de Higiene para el Sector Lácteo. Control de industrias lácteas y grasas comestibles. Ed. Instituto de Salud Pública. Dirección General de Salud Pública y Alimentación. Madrid. 2007.



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

[4] Wehr, H.H.; Frank, J.F.: "Standard Methods for the Examination of Dairy Products".  
Ed. American Public Health Association, Inc., Washington, D.C. 2004.