

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EL SISTEMA LACTOPEROXIDASA EN LECHE DE CABRA.
APLICACIÓN A LA MEJORA DE SU CALIDAD
MICROBIOLÓGICA**

PALOMA ZAPICO LANDROVE
MADRID, 1993

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



* 5 3 0 9 5 5 9 3 8 4 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**EL SISTEMA LACTOPEROXIDASA EN LECHE DE CABRA.
APLICACIÓN A LA MEJORA DE SU CALIDAD
MICROBIOLÓGICA**

MEMORIA PRESENTADA POR

PALOMA ZAPICO LANDROVE

PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE DOCTOR EN CC. BIOLÓGICAS POR
LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

DIRECTORES: DRA. MARGARITA MEDINA Y DR. MANUEL NUÑEZ

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
CIT - INIA

EL DOCTORANDO

VºBº LOS DIRECTORES

MARGARITA MEDINA FERNÁNDEZ-REGATILLO, COORDINADORA DE PROGRAMAS, Y MANUEL NUÑEZ GUTIERREZ, JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DEL CIT-INIA,

CERTIFICAN,

Que la Tesis titulada "El sistema lactoperoxidasa en leche de cabra. Aplicación a la mejora de su calidad microbiológica" de la que es autora PALOMA ZAPICO LANDROVE, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Producción y Tecnología de Alimentos del CIT-INIA, y cumple las condiciones exigidas para optar al Grado de Doctor en CC. Biológicas.

Madrid, 1 de Septiembre de 1993

Fdo.: Margarita Medina

Fdo.: Manuel Nuñez

AGRADECIMIENTOS

Quiero recordar con gratitud, por la ayuda y el apoyo recibidos, a Margarita Medina, Manuel Nuñez, Pilar Gaya, Máximo de Paz y a todos los compañeros del Departamento de Producción y Tecnología de Alimentos del C.I.T.-I.N.I.A.

RESUMEN

La calidad microbiológica de la leche de cabra presentó los siguientes niveles medios (expresados en log ufc/ml): 5.61 microorganismos totales, 3.91 Gram negativos, 2.83 psicrotrofos Gram negativos, 2.82 enterobacteriáceas, 2.80 coliformes, 2.37 coliformes fecales, 4.18 estafilococos y 2.67 estafilococos coagulasa positivos. Todos los grupos microbianos, salvo los psicrotrofos Gram negativos, alcanzaron sus niveles máximos en verano y los mínimos en invierno.

La actividad lactoperoxidasa de la leche cruda de cabra dió un valor medio de 1.55 U/ml. Los niveles medios de tiocianato fueron de 4.03 ppm. Se observó un efecto significativo del individuo y del tiempo de lactación sobre los niveles de lactoperoxidasa y de tiocianato. Los valores medios de la actividad lactoperoxidasa en la leche de cabra de las razas Verata y Murciano-Granadina durante la lactación fueron de 0.95 y 2.15 U/ml, respectivamente. El contenido medio de tiocianato resultó ser de 5.76 ppm para la raza Verata y de 3.20 ppm para la Murciano-Granadina. Se encontró un efecto significativo de la raza sobre los niveles de lactoperoxidasa y de tiocianato.

La activación del sistema lactoperoxidasa en leche cruda de cabra inhibió tanto a microorganismos totales como a psicrotrofos a temperaturas de refrigeración, siendo más efectiva sobre psicrotrofos. A 4°C y 8°C se encontraron valores de microorganismos totales significativamente más bajos en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado, con diferencias máximas de 0.8-0.9 unidades logarítmicas a los 4-6 días para 4°C y de 0.6-1.1 unidades logarítmicas a los 2-4 días para 8°C. Las diferencias máximas para psicrotrofos se observaron a 4°C a los 3-4 días, con valores 1.3-1.6 unidades logarítmicas inferiores en leche con el sistema lactoperoxidasa activado. A 20°C el sistema no inhibió el desarrollo de microorganismos totales. Sin embargo, el crecimiento de psicrotrofos resultó significativamente afectado, con niveles 0.7-1.2 unidades logarítmicas inferiores en la leche tratada a las 24-48 horas.

El sistema lactoperoxidasa resultó bactericida para *Pseudomonas fluorescens* a temperaturas de refrigeración y a temperatura ambiente. La población de *Ps. fluorescens* se redujo tras activar el sistema lactoperoxidasa 1.7 y 1.8 unidades logarítmicas a 4°C y 8°C, respectivamente, durante el primer día. A 4°C se alcanzó el nivel mínimo de *Ps. fluorescens* a los 2 días, manteniéndose prácticamente estable hasta los 5 días. Las diferencias máximas entre la leche control y la leche con el sistema lactoperoxidasa activado se observaron a los 5 días (5.2 unidades logarítmicas)

a 4°C y a los 3 días (4.8 unidades logarítmicas) a 8°C. La activación del sistema lactoperoxidasa permite el control del desarrollo de *Ps. fluorescens* en leche refrigerada durante 5-6 días a 4°C y durante 3-4 días a 8°C. El sistema lactoperoxidasa redujo los niveles de *Ps. fluorescens* en leche a 20°C en 0.8 unidades logarítmicas tras 8 horas, siendo la máxima diferencia entre la leche tratada y la control de 1.8 unidades logarítmicas a las 24 horas de incubación.

El desarrollo de *Escherichia coli* en leche de cabra fue muy reducido a 4°C, detectándose valores ligeramente inferiores en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado. El sistema lactoperoxidasa inhibió el crecimiento de *E. coli* a 8°C y a 20°C. A 8°C los niveles de este microorganismo en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado fueron significativamente más bajos durante los primeros 5 días, siendo la diferencia máxima de 1 unidad logarítmica a los 3 días. Aunque no se observó una reducción inicial en la leche tratada, sí se comprobó una fase de latencia más prolongada de *E. coli*. También a 20°C se observó un retraso en el crecimiento de *E. coli* en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado, con diferencias de 0.8 y 1.2 unidades logarítmicas a las 8 y 24 horas, respectivamente.

El sistema lactoperoxidasa de la leche de cabra mostró un efecto ligeramente bactericida sobre *Listeria monocytogenes* a 4°C y 8°C. Al activar el sistema en leche a 4°C, los niveles de este patógeno descendieron hasta el día 9 para las cepas Scott A y 5069 y hasta el día 3 para la cepa NCTC 11994. A 8°C descendieron hasta el día 7, 3 y 1, respectivamente. Después de 10 días a 4°C los niveles de *L. monocytogenes* en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado eran 1.6, 1.5 y 1.1 unidades logarítmicas inferiores a los de la leche control para las cepas Scott A, 5069 y NCTC 11994, respectivamente. A 8°C estas diferencias eran de 1.9, 0.8 y 0.4 unidades logarítmicas. A 20°C no se registró efecto bactericida, aunque se comprobó un retraso en el desarrollo de *L. monocytogenes* de 0.6-1.2 unidades logarítmicas a las 24 horas y de 0.3-1.3 unidades logarítmicas a los 3 días.

La activación del sistema lactoperoxidasa no afectó significativamente al comportamiento de *Staphylococcus aureus* a temperaturas de refrigeración. Tanto a 4°C como a 8°C el desarrollo de *Staph. aureus* fue muy reducido, no observándose actividad antimicrobiana tras activar el sistema. Sin embargo a 20°C, aunque el crecimiento de *Staph. aureus* fue muy reducido, se detectó un efecto significativo. Las diferencias entre la leche control y la tratada fueron significativas solamente a las 24 horas, no alcanzando en ningún caso las 0.3 unidades logarítmicas.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. PRODUCCIÓN, CARACTERÍSTICAS Y UTILIZACIÓN DE LA LECHE DE CABRA	1
1.1.1. Producción	1
1.1.2. Características	2
1.1.2.1. Lípidos	3
1.1.2.2. Compuestos nitrogenados	4
1.1.2.3. Sales minerales	4
1.1.3. Utilización	5
1.1.3.1. Quesos de cabra	5
1.1.3.1.1. Características químicas	6
1.1.3.1.2. Características microbiológicas	7
1.2. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE DE CABRA	9
1.2.1. Calidad microbiológica general	9
1.2.2. Incidencia de microorganismos de interés sanitario	10
1.3. EL SISTEMA LACTOPEROXIDASA	12
1.3.1. Componentes	12
1.3.1.1. Lactoperoxidasa	12
1.3.1.1.1. Características	13
1.3.1.1.2. Niveles	13
1.3.1.2. Tiocianato	15
1.3.1.2.1. Niveles	15
1.3.1.3. Peróxido de hidrógeno	16
1.3.2. Modo de acción del sistema lactoperoxidasa	17
1.3.2.1. Productos de oxidación del ión tiocianato	17
1.3.2.2. Acción sobre la célula bacteriana	18
1.3.3. Acción en vivo del sistema lactoperoxidasa	20
1.3.4. Aplicaciones del sistema lactoperoxidasa	21
1.4. EL SISTEMA LACTOPEROXIDASA EN LA MEJORA DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE Y DE LOS PRODUCTOS LÁCTEOS	23
1.4.1. Mejora de la calidad microbiológica de la leche cruda	23
1.4.1.1. Leche cruda refrigerada	24
1.4.1.2. Leche cruda a temperatura ambiente	25
1.4.2. Eliminación de microorganismos patógenos en los alimentos	26
1.4.2.1. Microorganismos Gram positivos	26
1.4.2.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	27
1.4.2.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	28
1.4.2.1.3. <i>Bacillus cereus</i>	29
1.4.2.2. Microorganismos Gram negativos	29
1.4.2.2.1. <i>Yersinia enterocolitica</i>	29

1.4.2.2.2. <i>Campylobacter jejuni</i>	29
1.4.2.2.3. Enterobacteriáceas	30
1.4.3. Aplicaciones en la fabricación de quesos	31
1.4.3.1. Efecto del sistema lactoperoxidasa sobre la fabricación del queso y otros productos lácteos fermentados	31
1.4.3.2. Efecto del sistema lactoperoxidasa sobre los fermentos lácticos	32
1.5. OBJETIVOS DE LA TESIS	34
2. MATERIAL Y MÉTODOS	35
2.1. EXPERIENCIAS REALIZADAS	35
2.1.1. Estudio de la calidad microbiológica de la leche de cabra	35
2.1.2. Estudio del sistema lactoperoxidasa en leche de cabra	36
2.1.3. Efecto de la activación del sistema lactoperoxidasa sobre los niveles de microorganismos totales y psicrotrofos Gram negativos en leche de cabra	36
2.1.4. Aislamiento de <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> de leche cruda de cabra	37
2.1.5. Efecto del sistema lactoperoxidasa en leche de cabra sobre algunos microorganismos causantes de alteraciones (<i>Pseudomonas fluorescens</i>) e indicadores (<i>Escherichia coli</i>)	37
2.1.5.1. Sobre <i>Pseudomonas fluorescens</i>	37
2.1.5.2. Sobre <i>Escherichia coli</i>	38
2.1.6. Efecto del sistema lactoperoxidasa en leche de cabra sobre algunos microorganismos patógenos (<i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>)	39
2.1.6.1. Sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	39
2.1.6.2. Sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	40
2.2. METODOLOGÍA EMPLEADA	41
2.2.1. Análisis microbiológicos	41
2.2.1.1. Diluciones decimales de la leche	41
2.2.1.2. Medios de cultivo	41
2.2.1.3. Detección de estafilococos coagulasa positivos	43
2.2.1.4. Detección de <i>Listeria</i>	43
2.2.2. Aislamiento e identificación de <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> a partir de leche cruda de cabra	44
2.2.2.1. <i>Escherichia coli</i>	44
2.2.2.2. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	46
2.2.2.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	47
2.2.3. Preparación de inóculos para los ensayos de inhibición por el sistema lactoperoxidasa	48
2.2.4. Análisis químicos	49
2.2.4.1. Ensayo de la actividad lactoperoxidasa	49
2.2.4.2. Determinación de tiocianato	49
2.2.5. Análisis estadístico	50

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
3.1. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE DE CABRA	51
3.1.1. Niveles de los principales grupos microbianos	51
3.1.2. Variación estacional	54
3.2. EL SISTEMA LACTOPEROXIDASA EN LECHE DE CABRA	66
3.2.1. Componentes del sistema lactoperoxidasa en leche de cabra durante la lactación	66
3.2.1.1. Lactoperoxidasa	66
3.2.1.2. Tiocianato	70
3.2.2. Influencia de la raza, individuo y tiempo de lactación sobre los componentes del sistema lactoperoxidasa en leche de cabra	70
3.2.2.1. Lactoperoxidasa	70
3.2.2.2. Tiocianato	78
3.3. ACTIVACIÓN DEL SISTEMA LACTOPEROXIDASA EN LECHE CRUDA DE CABRA. EFECTO SOBRE LOS MICROORGANISMOS TOTALES Y PSICROTROFOS GRAM NEGATIVOS DURANTE LA CONSERVACIÓN DE LA LECHE A TEMPERATURAS DE REFRIGERACIÓN Y A TEMPERATURA AMBIENTE	82
3.3.1. Comportamiento de los microorganismos totales y psicrotrofos Gram negativos (G-) a temperaturas de refrigeración (4°C y 8°C)	82
3.3.1.1. Microorganismos totales	82
3.3.1.2. Psicrotrofos Gram negativos	87
3.3.2. Comportamiento de los microorganismos totales y psicrotrofos Gram negativos a temperatura ambiente (20°C)	91
3.3.2.1. Microorganismos totales	91
3.3.2.2. Psicrotrofos Gram negativos	91
3.4. ACTIVACIÓN DEL SISTEMA LACTOPEROXIDASA EN LECHE CRUDA DE CABRA INOCULADA CON ALGUNOS MICROORGANISMOS CAUSANTES DE ALTERACIONES (<i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i>) E INDICADORES (<i>ESCHERICHIA COLI</i>)	96
3.4.1. Efecto de la activación del sistema lactoperoxidasa en leche cruda de cabra sobre los niveles de <i>Ps. fluorescens</i> durante la conservación de la leche a temperaturas de refrigeración y a temperatura ambiente	96
3.4.1.1. Comportamiento de <i>Ps. fluorescens</i> a temperaturas de refrigeración	96
3.4.1.2. Comportamiento de <i>Ps. fluorescens</i> a temperatura ambiente	101
3.4.2. Efecto de la activación del sistema lactoperoxidasa en leche cruda de cabra sobre los niveles de <i>E. coli</i> durante la conservación de la leche a temperaturas de refrigeración y a temperatura ambiente	104
3.4.2.1. Comportamiento de <i>E. coli</i> a temperaturas de refrigeración	104
3.4.2.2. Comportamiento de <i>E. coli</i> a temperatura ambiente	108

3.5. ACTIVACIÓN DEL SISTEMA LACTOPEROXIDASA EN LECHE CRUDA DE CABRA INOCULADA CON ALGUNOS MICROORGANISMOS PATÓGENOS (<i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> Y <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>) . . .	113
3.5.1. Efecto de la activación del sistema lactoperoxidasa en leche cruda de cabra sobre los niveles de <i>L. monocytogenes</i> durante la conservación de la leche a temperaturas de refrigeración y a temperatura ambiente	113
3.5.1.1. Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> a temperaturas de refrigeración	113
3.5.1.2. Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> a temperatura ambiente	118
3.5.1.3. Niveles de microorganismos totales, lactoperoxidasa y tiocianato	121
3.5.2. Efecto de la activación del sistema lactoperoxidasa en leche cruda de cabra sobre los niveles de <i>Staph. aureus</i> durante la conservación de la leche a temperaturas de refrigeración y a temperatura ambiente	129
3.5.2.1. Comportamiento de <i>Staph. aureus</i> a temperaturas de refrigeración	129
3.5.2.2. Comportamiento de <i>Staph. aureus</i> a temperatura ambiente	132
4. CONCLUSIONES	137
5. BIBLIOGRAFÍA	139

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Niveles de los principales grupos microbianos de la leche de cabra	52
Tabla 2. Niveles de los principales grupos microbianos en la leche de cabra durante el verano	55
Tabla 3. Niveles de los principales grupos microbianos en la leche de cabra durante el otoño	56
Tabla 4. Niveles de los principales grupos microbianos en la leche de cabra durante el invierno	57
Tabla 5. Niveles de los principales grupos microbianos en la leche de cabra durante la primavera	58
Tabla 6. Valores del pH de la leche de cabra en las distintas estaciones	59
Tabla 7. Nivel de significación del efecto estación sobre los distintos grupos microbianos en leche de cabra	65
Tabla 8. Niveles de lactoperoxidasa (U/ml) en leche de cabra durante la lactación	67
Tabla 9. Niveles de significación de los efectos individuo y tiempo de lactación sobre los componentes del sistema lactoperoxidasa	69
Tabla 10. Niveles de tiocianato (ppm) en leche de cabra durante la lactación	71
Tabla 11. Niveles de lactoperoxidasa (U/ml) en leche de cabra Verata durante la lactación	72
Tabla 12. Niveles de lactoperoxidasa (U/ml) en leche de cabra Murciano-Granadina durante la lactación	73
Tabla 13. Niveles de significación de los efectos raza, individuo y tiempo de lactación sobre los componentes del sistema lactoperoxidasa	77
Tabla 14. Niveles de tiocianato (ppm) en leche de cabra Verata durante la lactación	79
Tabla 15. Niveles de tiocianato (ppm) en leche de cabra Murciano-Granadina durante la lactación	80

Tabla 16. Niveles de microorganismos totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 4°C	83
Tabla 17. Niveles de microorganismos totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 8°C	84
Tabla 18. Niveles de significación de los factores principales sobre los grupos microbianos en leche conservada a 4°C y 8°C	85
Tabla 19. Niveles de microorganismos psicrotrofos Gram negativos (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 4°C	88
Tabla 20. Niveles de microorganismos psicrotrofos Gram negativos (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 4°C	89
Tabla 21. Niveles de microorganismos totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 20°C	92
Tabla 22. Niveles de significación de los factores principales sobre los grupos microbianos estudiados a 20°C	93
Tabla 23. Niveles de microorganismos psicrotrofos Gram negativos (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 20°C	93
Tabla 24. Niveles de <i>Ps. fluorescens</i> y totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 4°C	97
Tabla 25. Niveles de <i>Ps. fluorescens</i> y totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 8°C	98
Tabla 26. Niveles de significación de los factores principales sobre los grupos microbianos estudiados a 4°C y 8°C	100
Tabla 27. Niveles de <i>Ps. fluorescens</i> y totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 20°C	102
Tabla 28. Niveles de significación de los factores principales sobre los grupos microbianos estudiados a 20°C	102
Tabla 29. Niveles de <i>E. coli</i> y totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado(A) a 4°C	105
Tabla 30. Niveles de <i>E. coli</i> y totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 8°C	106

Tabla 31. Niveles de significación de los factores principales sobre los grupos microbianos estudiados a 4°C y 8°C	107
Tabla 32. Niveles de <i>E. coli</i> y totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 20°C	110
Tabla 33. Niveles de significación de los factores principales sobre los grupos microbianos estudiados a 20°C	110
Tabla 34. Niveles de <i>L. monocytogenes</i> (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 4°C	114
Tabla 35. Niveles de <i>L. monocytogenes</i> (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 8°C	115
Tabla 36. Niveles de significación de los factores principales sobre <i>L. monocytogenes</i> , totales viables, lactoperoxidasa y tiocianato a 4°C y 8°C	116
Tabla 37. Niveles de <i>L. monocytogenes</i> (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 20°C	119
Tabla 38. Niveles de significación de los factores principales sobre <i>L. monocytogenes</i> , totales viables, lactoperoxidasa y tiocianato a 20°C	119
Tabla 39. Niveles de totales viables (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 4°C y a 8°C	122
Tabla 40. Niveles de totales viables (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 20°C	124
Tabla 41. Niveles de lactoperoxidasa (U/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 4°C y 8°C	126
Tabla 42. Niveles de lactoperoxidasa (U/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 20°C	126
Tabla 43. Niveles de tiocianato (ppm) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 4°C y 8°C	127
Tabla 44. Niveles de tiocianato (ppm) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 20°C	127
Tabla 45. Niveles de <i>Staph. aureus</i> y totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 4°C	130

Tabla 46. Niveles de <i>Staph. aureus</i> y totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 8°C	131
Tabla 47. Niveles de significación de los factores principales sobre los grupos microbianos estudiados a 4°C y 8°C	133
Tabla 48. Niveles de <i>Staph. aureus</i> y totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 20°C	133
Tabla 49. Niveles de significación de los factores principales sobre los grupos microbianos estudiados a 20°C	134

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Variación estacional de totales viables, Gram negativos y psicrotrofos Gram negativos en la leche de cabra	60
Figura 2. Variación estacional de estafilococos y estafilococos coagulasa positivos en la leche de cabra	61
Figura 3. Variación estacional de enterobacteriáceas, coliformes y coliformes fecales en la leche de cabra	62
Figura 4. Evolución de la actividad lactoperoxidasa en la leche de cabra durante la lactación	68
Figura 5. Evolución de la actividad lactoperoxidasa en la leche de cabra Verata durante la lactación	75
Figura 6. Evolución de la actividad lactoperoxidasa en la leche de cabra Murciano-Granadina durante la lactación	76

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PRODUCCIÓN, CARACTERÍSTICAS Y UTILIZACIÓN DE LA LECHE DE CABRA

1.1.1. Producción

La producción mundial de leche de cabra, 8.1 millones de toneladas en 1987, se sitúa en cuarto lugar de la producción total de leche detrás de la de vaca, búfala y oveja. Europa es el principal productor después de Asia, siendo Francia, Grecia y España los países europeos que más leche de cabra producen. Tanto en España como en el resto del mundo la evolución es ascendente: 401 millones de litros en 1988, 414 en 1989 y 473 en 1990 (M.A.P.A., 1993). Las Comunidades Autónomas que más leche de cabra produjeron en 1990 fueron Andalucía, con 221 millones de litros, Castilla la Mancha, con 73 millones de litros, Canarias con 55 millones de litros y Castilla-León, con 29 millones de litros.

El desarrollo de este sector viene condicionado por una serie de factores que afectan tanto a la producción de leche de cabra como a su utilización. Estos factores son los siguientes:

- La ganadería está orientada principalmente hacia la carne.
- Las regiones donde se crían las cabras suelen ser montañosas o con suelos poco fértiles que sólo permiten el mantenimiento de estos animales, cuya alimentación es la vegetación natural existente y escasos forrajes.
- El número de productos elaborados a partir de leche de cabra es reducido, consistiendo fundamentalmente en quesos artesanales.

Estas razones explican la baja producción de la leche de cabra comparada con la de otras especies. Sin embargo, la creciente demanda de quesos de cabra, la adopción de sistemas ganaderos intensivos, la mayor investigación tanto de las características de la leche como de las características de los quesos y la ausencia de limitaciones en la producción de leche de cabra por parte de la Comunidad Europea han hecho que ésta aumente gradualmente.

Debido a las características del relieve de las zonas que mantienen ganado caprino se dan una serie de problemas en la recogida de la leche que influirán sobre la calidad microbiológica de ésta:

- El número elevado de ganaderos con rebaños pequeños y bajos niveles de producción.
- La dispersión de los ganaderos y la falta de infraestructura (canalización de agua corriente, electricidad, carreteras) para conservar y transportar la leche.
- La naturaleza estacional de la producción: la mayor producción se da en los meses de marzo a junio, por lo que frecuentemente se tiene que recoger la leche dos veces al día.
- Las pobres condiciones higiénicas y de equipamiento de los establos, debidas al generalmente bajo nivel económico y cultural de los ganaderos.

1.1.2. Características

Los datos sobre la composición química de la leche de cabra en España según Martín Hernández et al. (1988) son los siguientes: Extracto seco total: 12.04-17.48%; Grasa: 3.70-7.40%; Proteína: 3.11-3.75%; Caseína: 2.40-3.11%; Cenizas: 0.75-0.95%; pH: 6.33-6.61. Estos datos son similares a los de otros países productores. De todos los componentes los que presentan mayor variación son la proteína y la grasa (Juárez et al., 1991).

Los factores que afectan a la composición de la leche son los siguientes:

- La raza (Parkash & Jenness, 1968), sobre todo en el caso de la grasa (Ramos & Juárez, 1981).
- La variación estacional.
- La lactación.
- La alimentación.

Estos dos últimos factores han sido estudiados por diversos investigadores. Se han detectado variaciones del extracto seco total durante la lactación (Boroš, 1986), y una disminución de la cantidad de grasa y proteína a los 5 meses del período de lactación, para volver a aumentar al final de éste. Otros investigadores encontraron la mayor concentración de grasa, proteína y sales minerales en la época de menor producción (octubre a febrero) para decaer después de marzo, que es la época de mayor producción (Barbosa & Miranda, 1986). En cuanto al factor alimentación, una dieta pobre en grasa hace que la leche tenga a su vez un bajo contenido en grasa (Le Jaouen, 1972), mientras que el contenido en nitrógeno de la dieta no parece afectar al de la leche (Vignon, 1976). Cuando se aumenta la cantidad de energía de la dieta aumenta la producción, aunque no parece que tenga efecto sobre la composición (Jenness, 1980).

1.1.2.1. Lípidos

Los glóbulos de grasa de diámetro menor que 3 micras son más abundantes en la leche de cabra que en la de vaca (Le Mens, 1985). Estos glóbulos carecen de aglutininas en la leche de cabra. Por lo demás, tanto la composición y propiedades de la membrana del glóbulo como la composición lipídica en su interior son similares en ambos tipos de leche (Jenness, 1980).

El estudio de los ácidos grasos libres en leche de cabra y de vaca ha sido llevado a cabo por diversos investigadores. La cantidad de ácidos grasos de cadena corta y media (C_8 , C_{10} , C_{12}), volátiles e insolubles, es mayor en leche de cabra que en leche de vaca (Juárez & Ramos, 1986), así como la de ácido caprílico y cáprico que proporcionan el aroma característico a los quesos de cabra (Juárez et al., 1991).

Las fuentes de variación de los lípidos en general y de los ácidos grasos en particular son la dieta, los factores genéticos, el período de lactación y el almacenamiento. El factor más importante es la dieta (Morand-Fehr & Sauvant, 1980), tanto si se varía la energía como la cantidad o naturaleza de los lípidos. Por otra parte, se ha visto que hay mayor cantidad de ácidos grasos de cadena corta y media en el calostro que en la leche (Klobasa & Senft, 1970).

1.1.2.2. Compuestos nitrogenados

La leche de cabra tiene un contenido más alto en nitrógeno no proteico, menor cantidad de proteína coagulable y de caseínas, aunque mayor cantidad de caseína soluble que la leche de vaca (Grappin et al., 1981). Estas características determinan el que el coágulo de la leche de cabra sea menos firme, aunque de formación más rápida, con un mayor desuerado y de menor cohesión y rendimiento (Juárez et al., 1991).

La composición de las micelas de caseína es semejante en la leche de cabra y de vaca, pero varía su tamaño medio. Las micelas de caseína de la leche de cabra tienen más calcio y fósforo inorgánico, están menos solvatadas, pierden la caseína β más rápidamente y son menos estables frente a la temperatura (Jenness, 1980). Según este mismo autor, la leche de cabra contiene caseína κ , caseína β y caseína α_{s2} . Por otra parte, se ha comprobado que hay individuos que producen leche con un 20-25 % de caseína α_{s1} , mientras que otros producen leche carente de esta caseína (Remeuf et al., 1989). En todo caso, la relación α_s/β caseína es más baja en la leche de cabra que en la de vaca.

Otras proteínas presentes en la leche de cabra son las proteínas del suero: β lactoglobulina, α lactoalbúmina y seroalbúmina. En cuanto a las enzimas, hay menos ribonucleasa, lipasa y xantina oxidasa en la leche de cabra que en la leche de vaca (Jenness, 1980). Otras proteínas menores son la lactoferrina, transferrina, prolactina, inmunoglobulina y lisozima.

1.1.2.3. Sales minerales

Están presentes fundamentalmente en la leche de cabra el sodio, potasio, calcio, magnesio, fósforo y cloro. El calcio, fósforo, potasio y cloro son más abundantes en la leche de cabra que en la leche de vaca (Morand-Fehr & Flamant, 1983; Jenness, 1980). En general, la concentración de elementos minerales decrece durante las siete primeras semanas de lactación (Maraval & Vignon, 1982). Elementos traza como el hierro, cobre, zinc y manganeso se encuentran en proporciones semejantes en la leche de cabra y de vaca.

Finalmente, la leche de cabra contiene menos ácido N-acetilneuramínico, ácido orótico, folato y vitaminas B₂ y B₁₂ que la leche de vaca (Jenness, 1980).

1.1.3. Utilización

La mayor parte de la leche de cabra se utiliza para la fabricación de quesos, con Grecia a la cabeza de los países europeos seguida de Francia, España, Italia y Portugal. De los 473 millones de litros de leche que produjo España en 1990, 37 se consumieron directamente en la explotación, 46 se destinaron a la fabricación de queso en la explotación y 389 se comercializaron, de los cuales 364 fueron entregados a las industrias lácteas para la elaboración de quesos (M.A.P.A., 1993).

1.1.3.1. Quesos de cabra

En España se fabrican 25 variedades de queso de cabra puro y 21 a partir de mezclas de leche de cabra con leche de vaca y/o de oveja.

Los quesos de leche de cabra se pueden agrupar en tres grandes tipos (Juárez et al., 1991):

- Quesos frescos (Alicante, Cádiz, La Vera).
- Quesos de pasta blanda (Cáceres, Córdoba).
- Quesos de pasta prensada semiduros o duros (Acehuche, Valdeteja, Majorero, los Ibores).

Los quesos frescos se fabrican a partir de leche cruda sin añadir fermento o a partir de leche pasteurizada con dosis bajas de fermento y se consumen tras 2-10 días. Los quesos de pasta blanda se fabrican a partir de leche pasteurizada, añadiendo fermentos mesófilos, aromatizantes y acidificantes, e incorporándoles esporas del hongo *Penicillium candidum* que se desarrolla superficialmente. Estos quesos se consumen tras 15-45 días de maduración. Los quesos semiduros de pasta ligeramente prensada se fabrican a partir de leche cruda a la cual se añade cuajo animal extraído del estómago del cabrito. Estos quesos se moldean y prensan ligeramente, consumiéndose tras una maduración de 90 días o más tiempo si se conservan en aceite.

1.1.3.1.1. Características químicas

La composición química de algunos quesos de cabra ha sido estudiada por diversos autores.

TABLA I. Composición química de los quesos de cabra de los Ibores, Málaga y Palmero.

QUESO	HUMEDAD ^a	GRASA ^a	PROTEÍNA ^a	CENIZAS ^a
Málaga ¹	49.3	24.1	21.3	4.3
Ibores ²	37.1	35.3	21.7	5.6
Palmero ³	35.6	30.8	28.1	3.7

^a: g/100g queso

¹: Marcos et al. (1983)

²: Marcos et al. (1984)

³: Gómez et al. (1991)

El queso de los Ibores es un queso semiduro, extragrasso (55.9 g de grasa por 100 g de extracto seco) y de gran valor energético. Mas Mayoral et al. (1991) estudiaron el queso de los Ibores y comprobaron un alto contenido en extracto seco y grasa a los 60 días de maduración (65% y 43% respectivamente). Igualmente, el alto porcentaje de sal y el bajo pH (pH 5) al final de la maduración conducen a un queso con poca proteólisis y de pasta muy seca.

Fontecha et al. (1990) estudiaron el queso Majorero, que presentó a los 3 meses de maduración un 83.4% de extracto seco total y dentro de éste el 57.6% de grasa. El pH al final de la maduración fue de 5.4.

Los grados de humedad de los quesos de cabra varían desde el correspondiente a un queso duro (Palmero) hasta el correspondiente a un queso blando (Málaga). La actividad de agua del queso de Málaga es de 0.97, mientras que la del queso Majorero es tan sólo de 0.77 (Fontecha et al., 1990).

Los quesos duros o semiduros tienen un contenido en nitrógeno soluble alrededor del 20% del nitrógeno total. Fontecha et al. (1990) encontraron un valor de nitrógeno soluble de 33.8% para el queso Majorero. Los quesos blandos presentan del 10 al 20% de nitrógeno soluble.

El contenido en cloruro sódico varía en los quesos de cabra españoles desde 1.33 g/100 g de queso, en el Palmero (Gómez et al., 1991), hasta 3.77 g/100 g de queso, en el de los Ibores (Marcos et al., 1984).

En cuanto a los macrominerales, el contenido de fósforo y de potasio del queso de los Ibores es de 433 y 143 mg/100 g de queso, respectivamente (Marcos et al., 1984). Estos valores son similares a los de otros quesos de cabra. El calcio y el magnesio se encuentran en cantidades de 500-700 mg/100 g de queso y de 20-40 mg/100 g de queso, respectivamente. Los microminerales están representados por el zinc, hierro, cobre y manganeso. En el queso de los Ibores el zinc y el hierro tienen valores de 2.8 y de 0.6 mg/100 g de queso, respectivamente, valores similares a los de otros quesos españoles de cabra (Marcos et al., 1984).

Martín-Hernández & Juárez (1989) estudiaron el contenido en sales de quesos frescos, semiduros, Majorero y blando con flora superficial, comprobando en éstos últimos una desmineralización de calcio, fósforo, magnesio y zinc en el centro del queso. Se detectó una migración de calcio y fósforo a la superficie debido a las condiciones ácidas creadas por el crecimiento de *P. candidum*.

1.1.3.1.2. Características microbiológicas

Se ha investigado la evolución de la flora microbiana a lo largo de la maduración de varios tipos de queso fabricados a partir de leche cruda.

Fontecha et al. (1990) estudiaron el queso Majorero fabricado a partir de leche cruda y consumido tras una maduración de 3 meses. La flora predominante está constituida por estreptococos lácticos (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), seguidos de varias especies de *Lactobacillus* y de *Leuconostoc*. Los enterococos alcanzan valores elevados al principio de la maduración, descendiendo gradualmente a partir de los 30 días.

En el queso de Valdeteja de León, fabricado a partir de leche cruda y consumido a las 3 ó 4 semanas de maduración (Gutierrez et al., 1988), la evolución de los niveles de estreptococos lácticos, leuconostocs y lactobacilos, micrococos y enterobacteriáceas es similar a la del queso Majorero. Sin embargo, los mohos y levaduras aumentaron durante la maduración, desde niveles de 10^4 ufc/g en la cuajada hasta 10^6 ufc/g al final de la maduración.

El queso de Acehuche de Cáceres, fabricado a partir de leche cruda y consumido tanto fresco (4-10 días) como después de 45 días de maduración, presenta altos niveles de enterobacteriáceas (10^7 ufc/g al 4º día) y de coliformes (10^5 ufc/g al 15º día), así como de estafilococos coagulasa positivos ($> 10^4$ ufc/g). Los mohos y levaduras crecen hasta alcanzar 10^6 ufc/g en profundidad a los 30 días (Corisco et al., 1990).

El queso de los Ibores fabricado en Extremadura a partir de leche cruda de cabra presenta la peculiaridad del tratamiento superficial, tras 15 días de maduración, con pimentón y aceite. Mas Mayoral et al. (1991) evaluaron sus características microbiológicas, comprobando niveles bajos de enterobacteriáceas y de coliformes con valores inferiores a 10^2 ufc/g después de los primeros 30 días de maduración.

Finalmente, en el queso de Gredos fabricado a partir de leche cruda y consumido fresco durante la primera semana o conservado en aceite transcurridos 15 días de la elaboración, Medina et al. (1992) detectaron a los 4 días niveles superiores a 10^6 ufc/g de enterobacteriáceas y de coliformes y de 10^4 ufc/g de coliformes fecales. Los estafilococos coagulasa positivos presentaban altos niveles a los 4 días que se mantuvieron hasta los 15 días, descendiendo luego hasta el final de la maduración. Las enterobacteriáceas, coliformes y coliformes fecales decrecieron a partir de los 15 días, mientras que los enterococos se mantuvieron en niveles prácticamente constantes.

1.2. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE DE CABRA

Los estudios sobre la calidad microbiológica de la leche de cabra son escasos, tanto en España como en otros países, debido entre otras causas a la menor importancia económica de su producción respecto de la leche de vaca.

Debido a las diversas condiciones técnicas y de práctica higiénica de las regiones productoras, es lógico encontrar una gran variación en la calidad bacteriológica de la leche cruda de cabra, que en general ha demostrado ser pobre. Por otra parte, las diferencias composicionales de la leche de cabra y de vaca muestran la necesidad de establecer unos estándares específicos para la primera (Hinckley, 1991).

Según la Directiva 92/46/CEE, el contenido en gérmenes totales de la leche de cabra no podrá exceder, a partir del 1 de enero de 1994, de 5×10^5 /ml si la leche o los productos elaborados no reciben tratamiento térmico y de 1×10^6 /ml si reciben dicho tratamiento.

1.2.1. Calidad microbiológica general

En los trabajos publicados hasta la fecha se comprueba una gran variación de los niveles de microorganismos totales, que van desde 10^3 hasta 10^6 ufc/ml.

Varo et al. (1977) estudiaron la incidencia de distintos grupos microbianos en la leche cruda de cabras en régimen de semiestabulación, encontrando valores entre 1.0×10^4 y 5.4×10^7 ufc/ml de microorganismos totales. Estos altos niveles concuerdan con la media de 2.0×10^6 ufc/ml obtenida por Barbosa & Miranda (1986). Por otra parte, Mariscal (1987), estudiando la calidad microbiológica de la leche de cabra de varias regiones de Andalucía, encontró que el 94% de las muestras daban un recuento de microorganismos totales superior a 1.5×10^6 ufc/ml.

Jensen & Hughes (1980) encontraron en el 58.8% de las muestras valores superiores al límite recomendado para la leche cruda de vaca. Utilizando el límite estándar para la leche cruda de vaca, de 5.0×10^4 ufc/ml de totales, Cox & MacRae (1989) encontraron que el 22% de las muestras lo superaban. Por otro lado, Roberts (1985) da cuenta de un 79% de muestras en las que los niveles no sobrepasan

10^5 ufc/ml. En esta misma línea se sitúan los resultados de Tirard-Collet et al. (1991).

Los psicrotrofos resultan ser los microorganismos predominantes, oscilando entre 3.0×10^2 y 1.7×10^7 ufc/ml (Varo et al., 1977). Igualmente, Cox & MacRae (1989) dan cuenta de altos valores de psicrotrofos.

En cuanto a otros microorganismos, Barbosa & Miranda (1986) obtuvieron los siguientes resultados: 5.0×10^5 ufc/ml para bacterias lácticas, 2.0×10^6 ufc/ml para bacterias proteolíticas y 2.0×10^3 ufc/ml para levaduras y mohos. Varo et al. (1977) encontraron niveles máximos de levaduras de 2.1×10^5 ufc/ml y escasa incidencia de mohos. El nivel de microorganismos proteolíticos alcanzaba un máximo de 10^7 ufc/ml, no produciendo ni olores ni sabores anormales en la leche. Los microorganismos lipolíticos de la leche de cabra se encontraban en niveles comprendidos entre 2.0×10^4 y 1.9×10^7 ufc/ml.

1.2.2. Incidencia de microorganismos de interés sanitario

Varo et al. (1977) obtuvieron ausencia de coliformes en algunas muestras, mientras que en otras alcanzaban 1.5×10^5 ufc/ml. Autores como Jensen & Hughes (1980) y Cox & MacRae (1989) también informan de altos niveles de coliformes. Por otra parte, Roberts (1985) encontró que el 71% de las muestras tenía menos de 10^2 coliformes/ml y Tirard-Collet et al. (1991) obtuvieron menos de 10^3 coliformes/ml en la totalidad de las muestras.

La presencia de *Escherichia coli* se confirma en el 60% de los casos (Barbosa & Miranda, 1986; Jensen & Hughes, 1980). Roberts (1985) encontró menos de 10 ufc/ml de esta bacteria en el 90% de los casos.

Los datos obtenidos sobre los estafilococos no ofrecen mayor consenso. Mientras que unos autores detectan la presencia de *Staphylococcus aureus* en porcentajes cercanos al 60% (Barbosa & Miranda, 1986; Mariscal, 1987), otros lo hacen en el 5% (Roberts, 1985; Jensen & Hughes, 1980).

Chubb & Orchard (1985) aislaron de la parte externa de la ubre y de la leche mayoritariamente estafilococos coagulasa positivos, muchos de ellos hemolíticos. Sin embargo, ninguna de las cabras mostraba signos de mamitis y no se halló correlación

alguna entre el aislamiento de los estafilococos y la cantidad de neutrófilos en la leche. La leche vendida por las plantas lecheras contenía entre 5.4×10^2 y 4.9×10^4 estafilococos/ml. Según estos autores, aunque *Staph. aureus* es el patógeno más asociado a la mamitis caprina, se sabe que ésta puede ser causada por estafilococos coagulasa negativos. Además de *Staph. aureus*, otros estafilococos pueden producir enterotoxinas.

Varios autores han estudiado la incidencia de las diferentes especies de estafilococos en la leche de cabra. De Buyser et al. (1987) encontraron que *Staph. epidermidis* y *Staph. caprae* eran las especies predominantes en la leche de cabra producida en Francia. Ryan & Greenwood (1990) concluyeron que los estafilococos coagulasa negativos eran las principales bacterias responsables de la infección de las ubres, seguidas de *Staph. aureus*, estreptococos y coliformes. Finalmente Kalogridou-Vassiliadou (1991) obtuvo del total de estafilococos aislados de la leche de cabra porcentajes similares de *Staph. aureus*, *Staph. epidermidis* y *Staph. capitis*. Harvey & Gilmour (1988) aislaron de la leche de cabra cruda principalmente *Staph. aureus*, *Staph. epidermidis* y *Staph. simulans*. Tan sólo *Staph. aureus* producía enterotoxinas: concretamente el 35% de los aislamientos produjo enterotoxina C. Estos resultados concuerdan con los de De Buyser et al. (1987), aunque estos autores dan un mayor porcentaje de *Staph. aureus* productores de enterotoxina.

El consumo de leche cruda de cabra ha sido relacionado con brotes de campilobacteriosis (Harris et al., 1986). Por su parte, Roberts (1985) aisló *Campylobacter jejuni* en solamente una de las 2493 muestras analizadas.

La presencia de *Yersinia enterocolitica* varía según los distintos autores. Mientras que Roberts (1985) aisló este microorganismo de un 0.08% de las muestras, Jensen & Hughes (1980) lo hicieron del 12.8%. Walker & Gilmour (1986) aislaron del 26% de muestras de leche de cabra, vendida al por menor, microorganismos del género *Yersinia*, de los cuales la mayoría era *Y. enterocolitica* seguida de *Y. intermedia*.

En cuanto a otros patógenos, Roberts (1985) detectó *Salmonella* spp. en un 1.2% de las muestras y no aisló *Brucella* de ninguna muestra.

1.3. EL SISTEMA LACTOPEROXIDASA

En 1924, Hanssen observó que la leche recién ordeñada resultaba bactericida frente a *Bacillus typhosa* y *B. paratyphosa*, correlacionando este efecto con la presencia de enzimas oxidantes en la leche. Posteriormente, Wright & Tramer (1958) encontraron que la enzima lactoperoxidasa estaba implicada en la inhibición de estreptococos lácticos utilizados como fermentos en la fabricación del queso. Portman & Auclair (1959) observaron cómo al inactivarse la lactoperoxidasa desaparecía el efecto inhibitorio de la leche, mientras que añadiendo lactoperoxidasa pura se restablecía la actividad inhibitoria de la leche anteriormente inactivada.

1.3.1. Componentes

El sistema lactoperoxidasa se compone de la enzima lactoperoxidasa, que cataliza la reacción de oxidación del ión tiocianato por el peróxido de hidrógeno. La necesidad del substrato peróxido de hidrógeno fue establecida por Jago & Morrison (1962), y la del ión tiocianato por Reiter et al. (1963; 1964).

1.3.1.1. Lactoperoxidasa

La lactoperoxidasa pertenece al grupo de enzimas de las peroxidases, que junto con la catalasa y la peróxido dismutasa reducen el peróxido de hidrógeno gracias a una variedad de donantes de electrones y protegen a las células del metabolismo tóxico del oxígeno. Las peroxidases están ampliamente distribuidas en los tejidos de los mamíferos, encontrándose en las glándulas mamarias, salivares (Slowey et al., 1968), lacrimales y tiroides, así como en la mucosa intestinal y en el mucus cervical (Shindler et al., 1976).

La peroxidasa aislada de la leche es química e inmunológicamente similar a la salivar, recibiendo ambas el nombre de lactoperoxidasa. La lactoperoxidasa salivar del bebé actúa desde los primeros días después del parto, compensando la pequeña cantidad presente en la leche humana. El bebé secreta e ingiere continuamente la saliva que pasa al estómago e inicia su actividad antibacteriana. Por el contrario, el ternero carece prácticamente de lactoperoxidasa salivar. La saliva del ternero sólo llega al abomaso cuando va acompañada de leche, que constituye la fuente primaria de lactoperoxidasa en este animal.

Cuando las ubres están infectadas ($\geq 10^6$ leucocitos/ml), aumenta la actividad peroxidasa debido a que los leucocitos liberan mieloperoxidasa y peróxido de hidrógeno.

1.3.1.1.1. Características

La lactoperoxidasa fue purificada por Theorell & Åkesson (1943). Es una glicoproteína con un peso molecular de 78000 y un grupo hemo (Theorell & Pedersen, 1944). El contenido en hierro es de 0.068-0.071% y en carbohidrato de 9.9-10.2% (Carlström, 1969). El grupo hemo es una protoporfirina IX (Sievers, 1979).

Al ser la lactoperoxidasa una proteína cargada positivamente a pH neutro, se puede aislar por cromatografía de intercambio catiónico (Martín-Hernández et al., 1990; Yoshida & Xiuyun, 1991).

La lactoperoxidasa se inactiva parcialmente por pasteurización corta a 74°C (Wright & Tramer, 1958). Se inactiva totalmente si se calienta durante 15 minutos a 75°C. Sin embargo, si se calienta 15 segundos a 80°C sólo se reduce su actividad en un 40% (Griffiths, 1986). La lactoperoxidasa resiste la acidez, hasta un pH igual a 3 (Wright & Tramer, 1958), y la acción proteolítica del jugo gástrico (Gothefors & Marklund, 1975).

En cambio, esta enzima se inactiva irreversiblemente por un exceso de peróxido de hidrógeno (10 mM), al destruir los radicales superóxido e hidroxilo el grupo hemo (Kohler et al., 1986). Igualmente se inactiva por la luz en presencia de riboflavina y oxígeno (Martín-Hernández et al., 1990) o por un crecimiento excesivo de microorganismos (Kiermeier & Kaiser, 1960b).

La actividad inhibitoria de la lactoperoxidasa se puede revertir añadiendo al medio compuestos con grupos sulfhidrilo (Aune & Thomas, 1977).

1.3.1.1.2. Niveles

La leche de las diversas especies hasta ahora estudiadas presenta actividad lactoperoxidasa en distintos niveles.

Se han utilizado distintos sustratos para valorar la actividad de la lactoperoxidasa: pirogalol, O-dianisidina, O-fenilendiamina. Debido a su inestabilidad y a que alguno de ellos es peligroso para la salud se han sustituido por ABTS (2,2'-azino-di-(3-etilbenziazolina-6-ácido sulfónico).

Los resultados obtenidos por métodos distintos no pueden compararse. Así por ejemplo, los valores dados por Kiermeier & Kaiser (1960a) para la leche de vaca con el sustrato O-fenilendiamina son de 1.7-17.6 U/ml, mientras que Stephens et al. (1979) obtienen para la leche de vaca 0.74-3.89 U/ml con ABTS.

La actividad lactoperoxidasa, valorada con ABTS, en leche de distintas especies es la siguiente:

Vaca	1.4 U/ml (Stephens et al., 1979)
Búfala	0.9 U/ml (Härnolv & Kandasamy, 1982)
Oveja	0.8 U/ml (Medina et al., 1989)
Cabra	2.6 U/ml ^a (Reiter, 1985)
Cobaya	22.0 U/ml (Stephens et al., 1979)

^a: dato extraído de una única muestra.

Se ha determinado un límite de 0.02 U/ml para la capacidad inhibitoria de la lactoperoxidasa, en presencia de tiocianato y peróxido de hidrógeno (Reiter, 1981). Para revertir esta capacidad inhibitoria, se necesitaría una actividad catalasa de 120 U/ml no fisiológica (Björck, 1978).

La lactoperoxidasa, normalmente presente en niveles de 10 a 30 $\mu\text{g/ml}$, constituye el 1% de las proteínas del suero de leche de vaca (Reiter, 1985). La cantidad necesaria de enzima para que el sistema lactoperoxidasa sea eficiente es de 0.5-1.0 $\mu\text{g/ml}$ (Björck, 1978). En leche de vaca, Kern et al. (1962) establecieron que la actividad lactoperoxidasa dependía del ciclo sexual, período de lactación, estación, dieta y raza.

En leche de oveja, Medina et al. (1989) obtuvieron valores de actividad lactoperoxidasa desde un mínimo de 0.14 U/ml hasta un máximo de 2.38 U/ml,

detectando un efecto individuo, raza y época de muestreo sobre los niveles de actividad enzimática.

En general, la actividad lactoperoxidasa es baja en el calostro, alcanza un máximo a los 4-5 días postpartum, para disminuir rápidamente y estabilizarse el resto del período de lactación.

1.3.1.2. Tiocianato

El ión tiocianato se encuentra ampliamente distribuido en tejidos y secreciones animales. Se localiza en las glándulas mamarias, salivares, tiroides, y en el estómago (secretado por las células parietales al igual que el ácido clorhídrico), riñón y fluidos biológicos como el plasma o el líquido cefalorraquídeo.

Las fuentes de tiocianato son los glucosinolatos y los glucósidos cianogénicos. Las especies del género *Brassica* (familia *Cruciferae*) como la coliflor, berza y nabo son ricas en glucosinolatos, que forman tiocianato tras hidrólisis (Wood, 1975). Los glucósidos cianogénicos se encuentran en el maíz, la caña de azúcar, los guisantes y las habas. Al hidrolizarse forman cianuro, que reacciona con grupos tiosulfato y productos metabólicos de aminoácidos azufrados para convertirse en tiocianato. Esta reacción de detoxificación es catalizada por la enzima rodanasa que se encuentra en hígado, riñón y tiroides.

1.3.1.2.1. Niveles

La cantidad de ión tiocianato depende de la dieta. Tanto en la saliva como en el jugo gástrico del hombre se registran altas cantidades de tiocianato, 50-300 ppm y 40-50 ppm, respectivamente.

Se han encontrado concentraciones de 0.45 mM en el abomaso de terneros aparte de las cantidades ingeridas en la leche, que pueden oscilar entre 0.02 y 0.25 mM si las vacas consumen pastos naturales en los que hay trébol (contiene cianuro). Las vacas alimentadas con piensos dan menores cantidades de tiocianato en la leche (Reiter & Härnulf, 1984). Según estos mismos autores, se ha comprobado que las ubres infectadas ($\geq 10^6$ leucocitos/ml) tienen más cantidad de tiocianato en la leche al difundir éste desde el plasma sanguíneo (Korhonen, 1973).

La leche bovina contiene de 1 a 10 ppm de tiocianato (Boulangé, 1959). Esta cantidad varía con la estación, alimentación y estado de la ubre. Un suplemento en la dieta de 3 g/día de tiocianato no consiguió aumentar la cantidad de 10 ppm de este ión en la leche (Piironen & Virtanen, 1963).

Los niveles de tiocianato en la leche de oveja varían desde un mínimo de 0.4 ppm hasta un máximo de 20.6 ppm, con diferencias significativas entre individuos y tiempo de muestreo (Medina et al., 1989).

Un exceso de tiocianato en el organismo puede producir bocio al interferir con el metabolismo del yodo. Sin embargo, tanto la cantidad de leche ingerida como la concentración de tiocianato en la leche no llegan al límite necesario para poder afectar a la función tiroidea. Se requerirían dosis de 400 mg de tiocianato para poder producir alteraciones en dicha función. Igualmente, se necesitarían cantidades superiores a 20 ppm en el plasma humano para interferir con el metabolismo del yodo (IDF, 1988). Por otra parte, el tiocianato eleva los niveles de nitrosaminas, a $\text{pH} < 3.5$, en presencia de nitritos y aminos. Como el pH del jugo gástrico aumenta con la ingestión de la leche gracias a su capacidad tampón, no hay peligro de formación de tumores.

1.3.1.3. Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno es un agente oxidante, con efecto bactericida contra *E. coli* a concentraciones de 10-20 mM. En cambio, sólo se necesitan concentraciones de 0.01-0.02 mM para catalizar la oxidación del ión tiocianato, bromuro o yoduro por el sistema lactoperoxidasa.

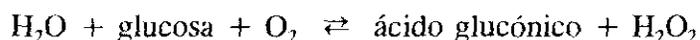
La leche no contiene peróxido de hidrógeno, ya que las cantidades del orden de nanomoles generadas por los leucocitos polimorfonucleares y difundidas a la leche son rápidamente inactivadas por acción de la catalasa y peroxidasa (Reiter & Härnulf, 1984). La xantina oxidasa, presente en la leche, puede producir peróxido de hidrógeno, pero los substratos (purinas, aldehidos y NADH_2) se encuentran en pequeñas cantidades.

Las fuentes naturales de peróxido de hidrógeno son los leucocitos polimorfonucleares y el metabolismo de las bacterias lácticas, Gram positivas y catalasa negativas, como lactobacilos, lactococos y estreptococos, que producen en

condiciones aerobias suficiente peróxido de hidrógeno como para activar el sistema lactoperoxidasa y autoinhibirse (Carlsson et al., 1983). Aunque es difícil de comprobar la presencia de peróxido de hidrógeno en la saliva y el jugo gástrico, debido a su rápida utilización, hay bacterias que lo producen en ambos casos (Marshall et al., 1982).

Para activar el sistema lactoperoxidasa hay que añadir exógenamente el peróxido de hidrógeno. Este se puede aportar químicamente, diluido o en forma sólida. Los peróxidos metálicos de sodio, magnesio o calcio no son estables y liberan el peróxido de hidrógeno aún conservados en atmósfera inerte, inactivando la enzima (Monnom et al., 1989).

El peróxido de hidrógeno se puede aportar también enzimáticamente gracias a la acción de enzimas como la glucosa oxidasa o la xantina oxidasa. La primera cataliza la siguiente reacción:



El peróxido de hidrógeno se consume rápidamente gracias al sistema lactoperoxidasa y no excede la concentración de 10 μM .

Sandholm et al. (1988) activaron la lactoperoxidasa contra patógenos de la mamitis, gracias al sistema glucosa oxidasa/glucosa. Se ha comprobado un mayor efecto con un aporte continuo de peróxido de hidrógeno que mediante una adición única (Pruitt & Reiter, 1985).

1.3.2. Modo de acción del sistema lactoperoxidasa

1.3.2.1 Productos de oxidación del ión tiocianato

La acción antimicrobiana del sistema lactoperoxidasa se atribuye a productos intermedios de la oxidación del tiocianato. Estos productos son, fundamentalmente, el ión hipotiocianito (OSCN^-) y los aniones de mayor oxidación como el del ácido cianosulfuroso (HO_2SCN) y el del ácido cianosulfúrico (HO_3SCN).

El metabolito principal es el hipotiocianito (Aune & Thomas, 1977), encontrándose en equilibrio con el ácido hipotiocianoso, con $\text{pK}_a=5.3$ (Hogg &

Jago, 1970). El ión hipotiocianito es bactericida en concentraciones de $\mu\text{mol/l}$ (Marshall & Reiter, 1980), comprobándose su acumulación en la reacción de oxidación del tiocianato catalizada por la lactoperoxidasa (Björck & Claesson, 1980). Además, el ión hipotiocianito no enzimático inhibe a *Streptococcus mutans* (Hoogendoorn et al., 1977).

Los otros iones de mayor nivel de oxidación se forman cuando el peróxido de hidrógeno se encuentra en mayor proporción que el tiocianato (Reiter & Hårnuly, 1984) y son aún menos estables que el hipotiocianito. Todos estos iones, producto de la oxidación del tiocianato, resultan ser termolábiles y se descomponen por calor a 60°C , durante 15 minutos (Björck et al., 1975).

Björck & Claesson (1980) comprobaron que mientras que el ión hipotiocianito es solamente bacteriostático para *E. coli*, los iones del ácido cianosulfuroso y cianosulfúrico son bactericidas para esta misma especie.

Los productos finales de la oxidación del tiocianato, CO_2 , NH_4^+ y SO_4^{2-} , son inertes.

1.3.2.2. Acción sobre la célula bacteriana

Los productos intermedios de oxidación del tiocianato tienen los siguientes efectos sobre la célula bacteriana:

- Inhiben el crecimiento.
- Inhiben la toma de oxígeno.
- Inhiben la producción de ácido láctico.
- Inhiben la acción enzimática de la hexoquinasa (Oram & Reiter, 1966; Adamson & Pruitt, 1981) y de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Carlsson et al., 1983).

El modo de acción del sistema lactoperoxidasa se ejerce a través de la oxidación de grupos SH de enzimas y proteínas (Aune & Thomas, 1978; Thomas & Aune, 1978). Sin embargo, la enzima D-lactato deshidrogenasa independiente de

SH también resulta inhibida (Law & John, 1981), por lo que parece que la lactoperoxidasa afecta, en este caso, al gradiente de protones de la membrana bacteriana.

La membrana citoplasmática bacteriana se altera y pierde potasio y aminoácidos al medio. Se inhibe la toma de glucosa, de bases nitrogenadas y de aminoácidos, por todo lo cual queda bloqueada la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos (Marshall, 1978). Otros autores dan cuenta de daños estructurales en la membrana bacteriana, con pérdida o toma defectuosa de nutrientes (Mickelson, 1977; Pruitt & Reiter, 1985).

La lactoperoxidasa inhibe la actividad lipasa lipoproteínica y, en consecuencia, la lipólisis en la leche. Se ha comprobado que el hipotiocianito, en concentraciones comparables a las producidas por la lactoperoxidasa, tiene los mismos efectos; la cisteína revierte la inhibición (Ahrné & Björck, 1985).

Pruitt et al. (1979) mostraron que la lactoperoxidasa se une a la superficie celular de *Strep. mutans*.

Los microorganismos Gram positivos, catalasa negativos, como estreptococos y lactobacilos, se autoinhiben en ambiente aerobio (Oram & Reiter, 1966) al producir peróxido de hidrógeno. El sistema lactoperoxidasa resulta para ellos bacteriostático. Marshall & Reiter (1980) comprobaron que la pared celular de los estreptococos es una barrera protectora más eficaz a la penetración de hipotiocianito que la membrana externa de *E. coli*.

Los microorganismos Gram negativos, catalasa positivos, como *Pseudomonas*, coliformes, *Salmonella* y *Shigella*, mueren en presencia del sistema lactoperoxidasa si el peróxido de hidrógeno se suministra química o enzimáticamente. Esta acción bactericida depende del pH del medio, del tiempo de incubación y de la temperatura (Björck et al., 1975).

Oram & Reiter (1966) encontraron que en las cepas de estreptococos resistentes es más alta que en las cepas sensibles la actividad de la enzima NADH₂ oxidasa, que cataliza la oxidación de NADH₂ por el ión hipotiocianito dando tiocianato.

Björck et al. (1979) estudiaron el nivel de microorganismos totales en leche cruda cuyo sistema lactoperoxidasa fue activado y comprobaron que la duración de la fase de latencia dependía de la temperatura de la leche y del nivel inicial de contaminación. Por otra parte, las bacterias que se encuentran en la fase estacionaria son más sensibles al sistema lactoperoxidasa que las células que se encuentran en la fase de crecimiento y que son metabólicamente activas (Sandholm et al., 1988). A su vez, son más susceptibles de inhibición las células que crecen anaeróbicamente que las que realizan metabolismo aerobio (Pruitt & Reiter, 1985).

1.3.3. Acción en vivo del sistema lactoperoxidasa

Reiter et al. (1980) demostraron la acción en vivo del sistema lactoperoxidasa contra *E. coli* en el fluido abomasal de terneros. La leche cruda que tomaban los terneros era la fuente de lactoperoxidasa y tiocianato, mientras que el peróxido de hidrógeno lo proporcionaban los lactobacilos que colonizan el esófago, estómago y duodeno, aunque en concentraciones subóptimas.

Reiter et al. (1970) y Mc Donald & Anderson (1981) realizaron varios experimentos para comprobar la actividad en vivo del sistema lactoperoxidasa contra bacterias patógenas que producen mamitis. Se ha visto que al principio del período de secado la lactoperoxidasa es muy activa contra *Strep. uberis*, uno de los principales causantes de la mamitis junto con *E. coli*. El sistema lactoperoxidasa no inhibe, en cambio, a *Staph. aureus*.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Marshall et al. (1986), cuyos experimentos mostraron que las secreciones de las glándulas mamarias recogidas 14 días antes y 7 días después del secado, así como tras el parto, inhibían el crecimiento de *Strep. uberis*. Sin embargo, las secreciones recogidas 21 días después del secado no eran inhibitorias frente a este microorganismo. Parece que el sistema lactoperoxidasa juega un papel, en vivo, a la hora de proteger la glándula mamaria lactante de la infección por *Strep. uberis*, volviéndose ineficaz cuando ésta involuciona.

Finalmente, se ha detectado hipotiocianito en la saliva humana (Mandel et al., 1983) y se sabe que las bacterias lácticas parcialmente resistentes a la lactoperoxidasa, presentes en la cavidad oral, producen peróxido de hidrógeno (Carlsson et al., 1983).

Se han realizado numerosos experimentos para demostrar que el sistema lactoperoxidasa no es tóxico para los animales. Según Reiter & Härnolv (1984), las células del hígado expuestas al sistema lactoperoxidasa no modifican su capacidad de respiración. Mientras que los eritrocitos se lisan al ser expuestos a la mieloperoxidasa/H₂O₂/Cl⁻, no lo hacen frente a la lactoperoxidasa/H₂O₂/SCN⁻. Parece, pues, que la membrana de las células eucariotas constituye una barrera eficaz frente a los productos de oxidación del tiocianato.

Mientras que cantidades de 3.4 ppm de peróxido de hidrógeno reducen en un 80% la incorporación de timidina por los fibroblastos humanos, cantidades de hasta 22.2 ppm de hipotiocianito no tienen este efecto. Además, el ión hipotiocianito no es mutagénico, al contrario que el peróxido de hidrógeno (White et al., 1983). Por lo tanto, el sistema lactoperoxidasa protege a las células eucariotas de los efectos tóxicos del peróxido de hidrógeno.

Los compuestos que intervienen en el sistema lactoperoxidasa (H₂O₂, SCN⁻, OSCN⁻) tienen corta vida y son sensibles a la pasteurización. Los productos finales de la reacción son inocuos. Sólo los iones de mayor oxidación (O₂SCN⁻) resultan tóxicos para las células de los mamíferos (Reiter, 1985), pero éstos se producen sólo cuando las concentraciones de peróxido de hidrógeno exceden a las de tiocianato.

1.3.4. Aplicaciones del sistema lactoperoxidasa

Para activar el sistema lactoperoxidasa son suficientes unas concentraciones tan bajas de tiocianato y de peróxido de hidrógeno como 12 ppm y 8 ppm respectivamente, lo que lleva a una concentración equimolar óptima de 0.25 mM de estos dos compuestos (Björck, 1978).

Las aplicaciones del sistema lactoperoxidasa son las siguientes:

- Mantener la calidad microbiológica de la leche.
- Aumentar la producción animal.
- Mejorar la higiene bucal en el hombre.

Se puede mantener la calidad microbiológica de la leche tanto refrigerada como en malas condiciones de recogida, a temperatura ambiente. En el primer caso, la lactoperoxidasa evita el crecimiento de psicrotófos, principalmente *Pseudomonas*, género productor de lipasas y proteasas resistentes a la pasteurización que alteran la calidad del queso (Reiter & Marshall, 1979).

En cuanto a la producción animal, Reiter et al. (1981) comprobaron el aumento de peso de los terneros alimentados con leche cruda a la que se le había añadido tiocianato y peróxido de hidrógeno. Se piensa que la lactoperoxidasa puede favorecer la colonización del intestino por la flora láctica, en detrimento de bacterias patógenas como *E. coli*, *Salmonella* o *Campylobacter*.

Rotgans & Hoogendoorn (1979) encontraron que el sistema lactoperoxidasa reduce la aparición de caries.

Como conclusión, podemos decir que:

- Se da una distribución amplia de los componentes del sistema lactoperoxidasa, tanto en el hombre como en los animales.
- Se da un efecto en vivo del sistema lactoperoxidasa.
- El sistema lactoperoxidasa produce un daño selectivo a la membrana bacteriana, pero no a las células eucariotas de los mamíferos.
- El sistema lactoperoxidasa es un sistema antibacteriano natural, seleccionado en la evolución de los mamíferos, que defiende las superficies mucosas (tracto gastrointestinal) de infecciones bacterianas y que protege a las células del peróxido de hidrógeno, ya sea producido por los propios tejidos animales o por las bacterias.

1.4. EL SISTEMA LACTOPEROXIDASA EN LA MEJORA DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE Y DE LOS PRODUCTOS LÁCTEOS

En 1957, la FAO (57/11/8655, Roma) estableció el uso del peróxido de hidrógeno, en cantidades de 300-500 ppm, para conservar la leche cruda. Sin embargo, el manejo del peróxido de hidrógeno requiere grandes precauciones, ya que es un agente oxidante potente. Se ha comprobado que afecta, en esas cantidades, a ciertas propiedades de la leche y que altera el sabor y la textura del queso, con pérdidas en el valor nutritivo de las proteínas. En muchos países está prohibida la adición de peróxido de hidrógeno a la leche.

Posteriormente, se demostró que pequeñas concentraciones de peróxido de hidrógeno activaban el sistema lactoperoxidasa, dando lugar a un efecto antibacteriano si se añadía una cantidad equivalente de tiocianato (Björck et al., 1975; Reiter et al., 1976; Björck, 1978). Björck (1978) estableció que 15 ppm de tiocianato eran suficientes para mejorar la calidad microbiológica de la leche cruda durante su almacenamiento. Reiter et al. (1964) comprobaron el efecto antibacteriano del sistema lactoperoxidasa sobre microorganismos Gram positivos y Björck et al. (1975) y Reiter et al. (1976) demostraron la marcada inhibición del sistema sobre los microorganismos psicrotrofos Gram negativos.

La acción del sistema lactoperoxidasa es específica contra las bacterias. Las proteínas de la leche contienen pocos grupos SH, siendo éstos inaccesibles y poco reactivos en la leche no calentada.

1.4.1. Mejora de la calidad microbiológica de la leche cruda

La eficacia del sistema lactoperoxidasa en la mejora de la calidad microbiológica de la leche cruda depende de varios factores:

- Número y tipo de microorganismos.
- Naturaleza de la alimentación y del entorno ambiental.
- Concentraciones molares de tiocianato/peróxido de hidrógeno.

- Temperatura de la leche.
- Tiempo de aplicación del sistema después del ordeño.
- Actividad catalasa positiva de los microorganismos.

El efecto antibacteriano del sistema lactoperoxidasa es inversamente proporcional a la temperatura y directamente proporcional a la calidad microbiológica inicial de la leche (Härnulf & Kandasamy, 1982). El mayor efecto antibacteriano del sistema lactoperoxidasa a bajas temperaturas puede deberse a que el producto de oxidación del tiocianato es más estable (Björck, 1978).

1.4.1.1. Leche cruda refrigerada

Entre los microorganismos psicrotrofos capaces de multiplicarse a 7°C y a temperaturas inferiores predomina el género *Pseudomonas*. Su crecimiento limita el almacenamiento de la leche cruda a temperaturas de refrigeración. Mientras que estos microorganismos son sensibles a la pasteurización, no lo son sus enzimas lipolíticas y proteolíticas (Björck, 1978).

Según Björck (1978), la leche cruda (sin activar el sistema lactoperoxidasa), con buena calidad microbiológica, se mantiene 48 horas a 5°C sin crecimiento de psicrotrofos. Cuando se activa el sistema lactoperoxidasa, ajustando las concentraciones de tiocianato y de peróxido de hidrógeno a 0.25 mM, se consigue alargar el período de almacenamiento de la leche cruda a 4°C hasta los 5 días, sin crecimiento de la flora psicrotrofa (Björck, 1978).

El sistema lactoperoxidasa es bactericida contra *Pseudomonas fluorescens* y *E. coli* en la leche (Björck et al., 1975). A 5°C, *Ps. fluorescens* no se multiplica hasta pasadas 72 horas (Björck, 1978).

Zajac et al. (1983a) mantuvieron la leche cruda durante 104 horas a 4°C sin incremento en los niveles de bacterias totales, coliformes y psicrotrofos, tras activar el sistema dos veces, a las 48 y 96 horas después del ordeño.

Martínez et al. (1988) almacenaron la leche cruda a 4°C durante 4, 6 y 8 días; posteriormente la pasteurizaron y la volvieron a almacenar a 8 y 16°C. En

todos los casos, la leche tratada con el sistema lactoperoxidasa activado a las 48 horas del ordeño y después de la pasteurización, se mantenía más tiempo sin alterarse. La vida media de la leche pasteurizada, cuando el almacenamiento de la leche cruda sobrepasaba los dos días, se prolongó gracias al sistema lactoperoxidasa. La activación del sistema lactoperoxidasa, unido a la pasteurización inmediata de la leche a 63°C/30 minutos, alarga a 20 días la vida media de la leche almacenada a 10°C. Mientras que en la leche control el crecimiento de la flora superviviente comienza a los 4 días de la pasteurización, en la leche tratada no lo hace hasta los 12 días (Kamau et al., 1991).

Finalmente, las propiedades físico-químicas de la leche no se ven afectadas por el sistema lactoperoxidasa. No se produce resistencia de *Ps. fluorescens* a repetidos tratamientos, ni se ha detectado acumulación alguna de cepas resistentes (Björck, 1978).

1.4.1.2. Leche cruda a temperatura ambiente

La mejora de la calidad microbiológica de la leche cruda mediante activación del sistema lactoperoxidasa, en condiciones adversas de recogida y transporte y a temperatura ambiente de hasta 38°C, se ha probado en varios países: Pakistán, Sri Lanka, India, Egipto, Méjico, China y Kenia.

El efecto bactericida del sistema lactoperoxidasa es dependiente de la temperatura y perdura 4 horas a 30°C (Björck et al., 1975). Björck et al. (1979) realizaron experimentos con leche cruda de vaca, en el laboratorio y en el campo, en Kenia. La activación del sistema lactoperoxidasa, llevando la concentración de tiocianato a 15 ppm y añadiendo 7.5 ppm de peróxido de hidrógeno, permitía un mayor tiempo de almacenamiento de la leche a temperatura ambiente. El efecto antibacteriano del sistema lactoperoxidasa permitió almacenar la leche cruda durante 7 u 8 horas, a 30°C. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kamau & Kroger (1984). Por debajo de esta temperatura el efecto es más duradero, de tal manera que unido a un sistema de refrigeración por agua permitiría almacenar la leche durante una noche, si se consigue bajar la temperatura a 15-20°C.

Härnolv & Kandasamy (1982) estudiaron los efectos del sistema lactoperoxidasa en la conservación de la leche cruda de vaca y de búfala, en Sri Lanka. Detectaron un efecto bactericida sobre parte de la flora a 30°C, y una fase

de latencia que duró 6 horas. El comportamiento de la leche de vaca y de búfala fue similar.

Sin embargo, Gupta et al. (1986), en India, encontraron que para conservar la leche de búfala, a 30°C, se necesitaban mayores cantidades de tiocianato y de peróxido de hidrógeno que para la de vaca. Mientras que la concentración óptima de tiocianato/peróxido de hidrógeno fue de 30/15 ppm para la leche de vaca, en el caso de la leche de búfala fue de 65/35 ppm. Estos autores aplicaban, además, una segunda dosis a las 4 horas de 25/15 ppm. En India, Thakar & Dave (1986) consiguen mayores tiempos de almacenamiento de la leche de búfala a 23°C, 30°C y 37°C con una concentración de tiocianato/peróxido de hidrógeno de 30/30 ppm. Chakraborty et al. (1986) conservaron la leche de búfala a 37°C durante 12-18 horas, activando el sistema lactoperoxidasa con dosis de 75/50 ppm de tiocianato/peróxido de hidrógeno. Una segunda dosis de 35 ppm de peróxido de hidrógeno a las 10 horas reactiva el sistema y reduce la excesiva cantidad de tiocianato. Mezclando la leche de la mañana, tratada de esta manera, con la de la tarde sin tratar se rebaja a 15 ppm el tiocianato y permite una única recogida de la leche al día.

1.4.2. Eliminación de microorganismos patógenos en los alimentos

1.4.2.1. Microorganismos Gram positivos

Varios autores estudiaron el efecto antibacteriano del sistema lactoperoxidasa frente a estreptococos (Wright & Tramer, 1958; Portmann & Auclair, 1959; Jago & Morrison, 1962). El sistema es bacteriostático frente a estos microorganismos (Oram & Reiter, 1966; Mickelson, 1979; Marshall & Reiter, 1980), exhibiendo algunos estreptococos cierta resistencia (Oram & Reiter, 1966; Hoogendoorn, 1976; Tenovuo et al., 1981). El sistema lactoperoxidasa se ha mostrado efectivo contra *Strep. pyogenes*, patógeno humano, y contra *Strep. agalactiae*, patógeno que produce mamitis (Mickelson, 1966 & 1976).

Thomas et al. (1983) estudiaron el efecto del sistema lactoperoxidasa sobre *Strep. mutans*, patógeno oral, catalasa negativo, capaz de producir cierta cantidad de peróxido de hidrógeno. La inhibición dependía de la cantidad de peróxido de hidrógeno producido, del pH y del contenido en grupos SH celulares. Todas las cepas fueron inhibidas al añadirse el peróxido de hidrógeno exógenamente.

1.4.2.1.1. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes, microorganismo patógeno para el hombre y los animales, es ubicuo en la naturaleza, encontrándose en el suelo, la vegetación y el agua. Esta bacteria ha sido aislada de la leche en un 4.2% de las muestras analizadas en Estados Unidos (Lovett et al., 1987) y en un 45% en España (Domínguez et al., 1985). La listeriosis en humanos produce septicemia, meningitis o aborto, afectando principalmente a embarazadas, recién nacidos e individuos inmunodeprimidos.

En Estados Unidos, Canadá y Europa se han producido recientemente brotes de listeriosis ligados al consumo de alimentos de origen vegetal y animal: ensalada de col (Schlech et al., 1983), leche (Fleming et al., 1985) y queso (Linnan et al., 1988). El riesgo de contaminación de alimentos por este microorganismo se debe a su relativamente alta resistencia al calor (Bradshaw et al., 1987), que según ciertos autores le permite resistir la pasteurización (Doyle et al., 1987; Fernández et al., 1987), y a su capacidad de crecimiento a temperaturas de refrigeración (Donnelly & Briggs, 1986).

Varios autores han estudiado el efecto del sistema lactoperoxidasa sobre *L. monocytogenes*. Se ha demostrado que el sistema lactoperoxidasa es bacteriostático para distintas cepas de *L. monocytogenes*, en distintos medios de cultivo y temperaturas de incubación (Earnshaw & Banks, 1989; Siragusa & Johnson, 1989; Bibi & Bachmann, 1990). Siragusa & Johnson (1989) detectaron una relación inversa entre la temperatura y la duración de la fase de latencia: de 73 a 98 horas a 5°C y de 2.8 horas a 30°C. Bibi & Bachmann (1990) encontraron unos tiempos superiores, de más de 100 horas a 8°C y de 6 horas a 30°C. La extensión de la fase bacteriostática depende del nivel inicial del inóculo del patógeno (Denis & Ramet, 1989).

Otros autores han encontrado un efecto bactericida del sistema lactoperoxidasa sobre las células de *L. monocytogenes*, que depende de la cantidad de inóculo inicial, medio de cultivo y temperatura de incubación. Así, Denis y Ramet (1989) dan unos valores D, en leche UHT, de 8 días a 4°C y de 5 días a 15°C, mostrando la relación directa de la efectividad del sistema con la temperatura, en su acción bactericida.

Se requiere un tiempo mayor para la inactivación total de las bacterias en leche UHT que en caldo tripticasa soja, debido a la influencia del medio (minerales, adsorción a proteínas, viscosidad y actividad del agua de la leche) sobre la actividad enzimática (Denis & Ramet, 1989).

El-Shenawy et al. (1990) detectaron un efecto bactericida que dependía del nivel inicial del inóculo. Las células se inactivaban totalmente en 2-4 horas, a 35°C, cuando los niveles del inóculo eran bajos, disminuyendo el efecto bactericida cuando eran altos. La actividad bactericida del sistema lactoperoxidasa frente a *L. monocytogenes* en leche cruda de vaca a temperaturas de refrigeración y a temperatura ambiente ha sido comprobada por Gaya et al. (1991), siendo dicha actividad dependiente de la cepa, el tiempo y la temperatura de incubación de la leche.

Además de su efecto bactericida sobre *L. monocytogenes*, el sistema lactoperoxidasa favorece la destrucción térmica de este patógeno (Kamau et al., 1990a y 1990b).

1.4.2.1.2. *Staphylococcus aureus*

Staph. aureus es un microorganismo patógeno que causa mastitis, pudiendo pasar a la leche desde las ubres del ganado infectado o desde el entorno, en el momento del ordeño. El crecimiento óptimo de esta bacteria se da entre 30°C y 37°C. La producción de enterotoxinas puede tener lugar entre los 10°C y los 45°C, con un máximo cerca de los 40°C. Mientras que *Staph. aureus* es destruido por la pasteurización, sus enterotoxinas resisten este tratamiento térmico y pueden ser una causa de intoxicaciones por alimentos (Pereira et al., 1982).

La actividad del sistema lactoperoxidasa sobre *Staph. aureus* ha sido investigada por Kamau et al. (1990a). Se detectó un efecto bactericida después de la activación del sistema, seguido de un crecimiento bacteriano, para alcanzar finalmente niveles semejantes a los controles. El tiempo necesario para alcanzar la mitad de los niveles máximos a 10°C fue 36 horas superior con el sistema activado, siendo 2.4 horas superior a 37°C. Además, se ha comprobado que el sistema lactoperoxidasa aumenta la destrucción térmica de *Staph. aureus* (Kamau et al., 1990b).

1.4.2.1.3. *Bacillus cereus*

Zajac et al. (1981) estudiaron el efecto del sistema lactoperoxidasa sobre las células vegetativas y las esporas de *B. cereus*, microorganismo que suele estar presente en la leche cruda. Estos autores encontraron que el sistema lactoperoxidasa era bactericida contra las células vegetativas de *B. cereus*, teniendo muy poco efecto contra sus esporas, debido probablemente a la inaccesibilidad de la membrana citoplasmática de estas últimas.

1.4.2.2. Microorganismos Gram negativos

El sistema lactoperoxidasa es efectivo contra bacterias Gram negativas como *Ps. fluorescens* y *E. coli* (Björck et al., 1975; Reiter et al., 1976), *S. typhimurium* (Reiter et al., 1976) y *Y. enterocolitica* (Farrag et al., 1992).

1.4.2.2.1. *Yersinia enterocolitica*

Tanto en Europa como en Estados Unidos se han dado varios brotes de yersiniosis ligados al consumo de leche pasteurizada. *Yersinia enterocolitica* ha sido aislada a partir de leche cruda (Schiemann, 1979).

Farrag et al. (1992) detectaron un efecto bactericida del sistema lactoperoxidasa sobre *Y. enterocolitica* en leche cruda, que dependía de los niveles iniciales del patógeno y de la temperatura de incubación. A 30°C, la reducción comienza a las 2 horas y es máxima 12 horas después de la activación, a partir de las cuales se reanuda el crecimiento. A 4°C, el máximo efecto bactericida se produce a los 5 días de la activación del sistema lactoperoxidasa.

1.4.2.2.2. *Campylobacter jejuni*

Campylobacter jejuni es un patógeno que causa enteritis aguda en el hombre (Blaser et al., 1980). Una fuente importante de infección es la carne de aves de corral (Shanker et al., 1982), pero el consumo de leche cruda también se ha relacionado con brotes de esta enfermedad (Porter & Reid, 1980; Robinson & Jones, 1981; Taylor et al., 1982). *C. jejuni* ha sido aislado del tracto intestinal bovino, pero no ha podido ser aislado frecuentemente de la leche cruda. La leche puede ser contaminada a través de las heces o de las ubres mamíticas, ya que se conoce la

capacidad de varias cepas de este patógeno de producir mamitis en las vacas. La pasteurización a 72°C durante 15 s destruye completamente a *C. jejuni*.

Varios autores han estudiado el efecto del sistema lactoperoxidasa sobre este microorganismo. La activación del sistema lactoperoxidasa en la leche cruda de vaca reduce drásticamente el número de células viables de *C. jejuni*, siendo el efecto bactericida mayor a 30°C que a 7°C (Beumer et al., 1985). El mismo efecto se consigue cuando se añade lactoperoxidasa a la leche esterilizada. En cambio, la inactivación del sistema lactoperoxidasa permite la supervivencia y multiplicación de *C. jejuni*. El efecto bactericida del sistema lactoperoxidasa sobre *C. jejuni* en leche UHT fue máximo a 37°C y pH 6.6, decreciendo a menor temperatura y pH (Borch et al., 1989).

1.4.2.2.3. Enterobacteriáceas

El efecto del sistema lactoperoxidasa contra microorganismos entéricos que pueden contaminar los preparados de leche infantil, produciendo diarreas que llegan a ser mortales, principalmente en países en vías de desarrollo, ha sido investigado por varios autores.

En la leche infantil, rehidratada con agua de lago y suplementada con el sistema lactoperoxidasa activado, no crecen las enterobacteriáceas y los coliformes permanecen inhibidos durante 48 horas a 30°C (Banks & Board, 1985).

Igualmente, Earnshaw et al. (1990) encontraron un efecto bacteriostático del sistema lactoperoxidasa sobre *E. coli*. El efecto fue bactericida sobre *S. typhimurium*. Cuando se aumentaba el aporte de peróxido de hidrógeno añadiendo, además del sistema glucosa/glucosa oxidasa, peróxido de urea, se aumentaba el efecto bactericida sobre *S. typhimurium* y se reducían también los niveles de *E. coli*.

Los estudios llevados a cabo por Wray & McLaren (1987) sobre el efecto del sistema lactoperoxidasa contra *S. typhimurium*, en leche cruda acidificada e in vivo, confirman los anteriores resultados. Estos autores mostraron que las cepas rugosas eran más susceptibles de inhibición que las lisas. Farrag et al. (1992) detectaron un efecto bactericida del sistema lactoperoxidasa sobre *E. coli* en leche cruda, que dependía de los niveles iniciales del microorganismo y de la temperatura de incubación. A 30°C, el efecto bactericida fue máximo a las 6 horas de la activación

para un nivel de inóculo alto y a las 12 horas para un nivel bajo. Pasadas las 24 horas, el microorganismo crece hasta alcanzar los valores de los controles. En cambio, a 4°C la reducción de *E. coli* fue máxima a los 5 días de la activación del sistema lactoperoxidasa.

1.4.3. Aplicaciones en la fabricación de quesos

1.4.3.1. Efecto del sistema lactoperoxidasa sobre la fabricación del queso y otros productos lácteos fermentados

La activación del sistema lactoperoxidasa permite conservar la leche cruda durante períodos cortos de tiempo a temperatura ambiente, antes de ser procesada.

Zall et al. (1983a y 1983b) fabricaron quesos Cottage y Cheddar a partir de leche conservada durante 8 días con el sistema lactoperoxidasa y posteriormente pasteurizada a 73°C/16s. El queso Cottage fabricado a partir de leche tratada produjo un 2% más de rendimiento que el control. Las características organolépticas de los quesos Cottage y Cheddar tratados fueron diferentes a las de los controles, aunque no fueron defectuosas (Zall et al., 1983a). El queso Cheddar fabricado a partir de leche tratada presentó una cuajada más débil y con producción de ácido más lenta que en el control, tardando el suero 2 horas más en llegar a la acidez deseable para moler la cuajada (Zall et al., 1983b).

En la fabricación de queso fresco, Lara et al. (1987) encontraron que el tiempo de coagulación de la leche tratada fue mayor que el de la leche control, debido a una menor acidificación. El rendimiento en humedad y extracto seco fue mayor para el queso de leche tratada que para el control, ya fuera fabricado a partir de leche cruda o de leche pasteurizada. Los niveles de totales, pH y apariencia del queso de leche tratada fueron aceptables. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Zall et al. (1983a).

Pseudomonas es un género que produce alteraciones en queso Cottage, junto con las enterobacteriáceas que también contaminan este producto. Earnshaw et al. (1989) activaron el sistema lactoperoxidasa en el queso Cottage mediante adición de sus tres componentes. El sistema se mostró eficaz a la hora de reducir los niveles de *Pseudomonas*, *E. coli* y *S. typhimurium*, incrementando la vida media y la

estabilidad del queso. El tratamiento no afectó ni al pH ni a las propiedades sensoriales del queso.

En cuanto a otros productos lácteos fermentados, la mantequilla fabricada a partir de leche tratada con el sistema lactoperoxidasa resultó tener un sabor extraño y amargo (Zall et al., 1983b). Por su parte, el yogurt fabricado a partir de leche tratada con el sistema lactoperoxidasa no presentó diferencias significativas en la composición química o en las propiedades organolépticas frente al yogurt control (Zall et al., 1983b; Mehanna & Hefnawy, 1988).

1.4.3.2. Efecto del sistema lactoperoxidasa sobre los fermentos lácticos

Mientras que la leche pasteurizada durante 30 minutos a 95°C es lactoperoxidasa negativa, cuando se pasteuriza a temperatura más baja y tiempo corto (72°C/15 s) permanece el 55% de la actividad lactoperoxidasa, resultando inhibitoria para la mayor parte de los fermentos lácticos.

Las distintas cepas pueden tener una sensibilidad diferente al sistema lactoperoxidasa, resultando unas claramente inhibidas, mientras que otras son resistentes o incluso son estimuladas por él (IDF, 1991).

La inhibición del sistema lactoperoxidasa sobre los fermentos lácticos depende de:

- La cantidad de peróxido de hidrógeno producido por las distintas cepas.
- La composición de la leche.

Se sabe que la producción de peróxido de hidrógeno por los lactococos depende de la relación entre la actividad de enzima NADH oxidasa, que genera peróxido de hidrógeno, y la actividad de NADH peroxidasa, que lo destruye (IDF, 1991).

Guirguis & Hickey (1987) encontraron que la mayor parte de las cepas de bacterias lácticas termófilas ensayadas eran sensibles a la inhibición por el sistema lactoperoxidasa (sólo tres resultaron resistentes), variando su grado de susceptibilidad según su capacidad de generar peróxido de hidrógeno. Mientras que

Lb. acidophilus y tres cepas de *Lb. bulgaricus* se inhibían en presencia de lactoperoxidasa y tiocianato, *Lb. helveticus*, *Strep. thermophilus* y una cepa de *Lact. lactis* requerían para ser inhibidos una fuente externa de peróxido de hidrógeno.

Al activar el sistema lactoperoxidasa de la leche cruda, añadiendo tiocianato y peróxido de hidrógeno, se redujo la actividad de un cultivo mixto de cepas termófilas, retrasándose 4.5 horas el tiempo de coagulación (Valdez et al., 1988).

Roginski et al. (1984a) encontraron que la leche de verano inhibe menos que la de invierno, debido a que tiene más compuestos con grupos SH termolábiles que contrarrestan el efecto del sistema lactoperoxidasa. Por otro lado, no se sabe si existe una relación directa entre la cantidad de tiocianato en la leche y la inhibición por el sistema lactoperoxidasa. Roginski et al. (1984b) encontraron, incluso, un efecto estimulador del tiocianato sobre el crecimiento de los fermentos lácticos mesófilos cuando se encontraba en concentraciones molares mayores que las del peróxido de hidrógeno.

1.5. OBJETIVOS DE LA TESIS

La producción mundial de leche de cabra se sitúa en cuarto lugar detrás de la de vaca, búfala y oveja, aumentando en los últimos años. Europa es el principal productor después de Asia, y Francia, Grecia y España los países europeos que más leche de cabra producen. La calidad microbiológica de la leche de cabra presenta una gran variación debido a los diversos factores de producción que influyen en ella: número elevado y dispersión de ganaderos con rebaños reducidos, naturaleza estacional de la producción e infraestructura deficiente, con pobres condiciones higiénicas de los establos.

Debido a las circunstancias arriba mencionadas, el presente trabajo pretende contribuir a la mejora de la calidad microbiológica de la leche cruda de cabra mediante la activación del sistema lactoperoxidasa, sistema inhibitorio presente de forma natural en la leche, así como estudiar su actividad frente a microorganismos indicadores, microorganismos causantes de alteraciones y microorganismos patógenos.

Los objetivos de esta Tesis son los siguientes:

- Evaluar la calidad microbiológica de la leche cruda de cabra, mediante la recogida de muestras de diversos ganaderos y en distintas épocas del año.
- Estudiar el sistema lactoperoxidasa en leche cruda de cabra, así como la influencia de la raza, del individuo y de la época de lactación sobre los niveles de los componentes del sistema lactoperoxidasa.
- Investigar la influencia de la activación del sistema lactoperoxidasa sobre la calidad microbiológica global de la leche cruda de cabra mantenida a temperaturas de refrigeración y a temperatura ambiente.
- Investigar la influencia de la activación del sistema lactoperoxidasa sobre la supervivencia de microorganismos causantes de alteraciones, microorganismos indicadores y microorganismos patógenos a temperaturas de refrigeración y a temperatura ambiente.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. EXPERIENCIAS REALIZADAS

2.1.1. Estudio de la calidad microbiológica de la leche de cabra

Se ha investigado la calidad microbiológica de la leche de cabra procedente de un total de 15 ganaderos durante las cuatro estaciones del año, mediante dos tomas de muestras por estación. Se ha determinado el efecto de la estación sobre dicha calidad microbiológica.

Las tomas de muestras se efectuaron sobre la leche entregada a una Central Lechera de la provincia de Ávila. Las muestras individuales, correspondientes a cada ganadero, se recogieron en frascos estériles, registrándose la temperatura de la leche y la presencia o ausencia de agua oxigenada en el momento de la toma de muestra.

Las muestras fueron transportadas en nevera con hielo fundente hasta el laboratorio donde fueron analizadas inmediatamente. El tiempo transcurrido entre la recogida de la leche y el análisis en el laboratorio no sobrepasó las 4 h.

Se determinó el pH de cada muestra, se hicieron las diluciones necesarias y se sembraron en los distintos medios de cultivo, por duplicado. Los medios y condiciones de incubación se recogen en el apartado 2.2.1.2.

Se efectuaron determinaciones de microorganismos totales, Gram negativos, psicrotrofos Gram negativos, estafilococos, enterobacteriáceas, coliformes, coliformes fecales, *Brucella* y *Listeria* (ver apartado 2.2.1.2.).

Para establecer la proporción de *Staph. aureus* entre los microorganismos que crecieron en el medio ETGPA, se realizó el test de la coagulasa (Baird-Parker, 1979) sobre 10 colonias de cada muestra.

La presencia de *L. monocytogenes* se investigó además, tras añadir 25 ml de leche a 225 ml de caldo de enriquecimiento, mediante una prueba de hibridación de sondas de DNA.

2.1.2. Estudio del sistema lactoperoxidasa en la leche de cabra

Se han estudiado los niveles de lactoperoxidasa y de tiocianato de la leche de cabra de dos razas españolas, Verata y Murciano-Granadina, así como de un rebaño cruzado de razas múltiples. El estudio se realizó durante 5 meses de lactación desde el momento del parto. Se determinó la influencia de la raza, individuo y tiempo de lactación sobre los componentes del sistema lactoperoxidasa.

Se recogieron muestras de leche de 10 cabras de cada uno de los tres rebaños analizados (Verata, Murciano-Granadina y cruzado de razas múltiples). Las muestras se tomaron durante las primeras 24 h después del parto y a los 3, 7, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 y 150 d. Las muestras, recogidas individualmente en el ordeño de la mañana, se mantuvieron a 4°C hasta su posterior análisis.

La actividad lactoperoxidasa se determinó para cada muestra por duplicado, según el método descrito por Marshall et al. (1986) (ver apartado 2.2.1).

Los niveles de tiocianato se determinaron para cada muestra por duplicado siguiendo el método de Björck et al. (1975) (ver apartado 2.2.2).

2.1.3. Efecto de la activación del sistema lactoperoxidasa sobre los niveles de microorganismos totales y psicrotrofos Gram negativos en leche de cabra

Se ha estudiado el efecto de la activación del sistema lactoperoxidasa sobre los niveles de microorganismos totales y sobre la flora psicrotrofa Gram negativa presente en leche cruda de cabra mantenida durante 7 d a temperaturas de refrigeración (4°C y 8°C) y durante 2 d a temperatura ambiente (20°C). Los experimentos se realizaron por duplicado.

La leche fue recogida de un tanque de mezcla de los ordeños de la noche y de la mañana, y transportada al laboratorio a temperatura de refrigeración. En un lapso de tiempo no mayor de 2 h se inició el experimento.

Se repartieron 100 ml de leche cruda en frascos estériles de 250 ml de capacidad, marcados con los diferentes tiempos de incubación. La activación del sistema lactoperoxidasa se efectuó mediante la adición de 1 ml de una solución acuosa 25 mM de tiocianato sódico, estéril, y de 1 ml de una solución acuosa 25

mM de peróxido de hidrógeno al 30% en agua estéril, preparada en el momento de la activación.

Los frascos activados junto con los frascos control, a los que no se había adicionado tiocianato sódico ni peróxido de hidrógeno, fueron incubados a 4°C, 8°C y 20°C en baños termostatzados.

Se tomaron muestras de leche antes de activar el sistema, correspondientes a las 0 h, a las 8, 24 y 32 h y a los 2, 3, 4, 5, 6 y 7 d de la activación del sistema lactoperoxidasa para las muestras incubadas a 4°C y 8°C y a las 8, 24, 32 h y 2 d de la activación del sistema lactoperoxidasa para las muestras incubadas a 20°C. Se determinó el pH y se efectuaron determinaciones de microorganismos totales y psicrotrofos Gram negativos. Una alícuota de la muestra de leche 0 h se utilizó en el ensayo de la actividad lactoperoxidasa y de tiocianato.

2.1.4. Aislamiento de *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *Staphylococcus aureus* de leche cruda de cabra

Con el fin de disponer de aislamientos de *E. coli*, *Ps. fluorescens* y *Staph. aureus* de leche cruda de cabra para su inoculación en leche en las siguientes experiencias de efecto del sistema lactoperoxidasa sobre microorganismos indicadores, alterantes y patógenos, se procedió al aislamiento e identificación de miembros de dichas especies a partir de las muestras de leche cruda de cabra estudiadas. La metodología empleada se indica en el apartado 2.2.2. del presente trabajo.

2.1.5. Efecto del sistema lactoperoxidasa en leche de cabra sobre la supervivencia de algunos microorganismos causantes de alteraciones (*Pseudomonas fluorescens*) e indicadores (*Escherichia coli*)

2.1.5.1. Sobre *Pseudomonas fluorescens*

Se ha estudiado el efecto del sistema lactoperoxidasa sobre la supervivencia de *Ps. fluorescens* inoculada en leche cruda de cabra de baja contaminación, durante 7 d a temperaturas de refrigeración (4°C y 8°C) y durante 3 d a temperatura ambiente (20°C). Los experimentos se realizaron por duplicado.

Se utilizó leche de la mejor calidad bacteriológica posible. Para ello, el ordeño se efectuó sobre un recipiente previamente flameado con alcohol y tras limpiar cuidadosamente las ubres. La leche fue transportada al laboratorio a temperatura de refrigeración. En un lapso de tiempo no mayor de 2 h se inició el experimento.

El inóculo consistió en una mezcla de los cultivos de tres cepas de *Ps. fluorescens*, previamente aisladas e identificadas a partir de leche de cabra y que no mostraron inhibición cruzada. La concentración final de *Ps. fluorescens* fue de aproximadamente 10^4 ufc/ml de leche.

La activación del sistema lactoperoxidasa se efectuó según lo indicado en el apartado 2.1.3. Los frascos fueron incubados a 4°C, 8°C y 20°C.

Se tomaron muestras a las 0 h, antes de la inoculación y de la activación del sistema lactoperoxidasa, a los 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 d para 4°C y 8°C y a las 8 h, 1, 2 y 3 d para 20°C. Se determinó el pH y se efectuaron recuentos de *Ps. fluorescens* y de microorganismos totales por duplicado. Una alícuota de la muestra de 0 h fue utilizada para un posterior ensayo de actividad lactoperoxidasa y de tiocianato.

2.1.5.2. Sobre *Escherichia coli*

Se ha estudiado el efecto del sistema lactoperoxidasa sobre la supervivencia de *E. coli* inoculada en leche cruda de cabra de baja contaminación, mantenida 7 d a temperaturas de refrigeración (4°C y 8°C) y 3 d a temperatura ambiente (20°C). Los experimentos se realizaron por duplicado.

Se utilizó leche obtenida según lo indicado en el apartado anterior.

El inóculo consistió en una mezcla de los cultivos de tres cepas de *E. coli*, previamente aisladas e identificadas a partir de leche de cabra y que no mostraron inhibición cruzada. Se inocularon 0.2 ml de una dilución 10^{-2} de cultivo a frascos estériles con 100 ml de leche cruda para obtener una concentración final de *E. coli* de aproximadamente 10^4 ufc/ml de leche.

La activación del sistema lactoperoxidasa se efectuó según lo indicado en el apartado 2.1.3. Los frascos fueron incubados a 4°C, 8°C y 20°C.

Se tomaron muestras a las 0 h, antes de la inoculación y de la activación del sistema lactoperoxidasa, a los 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 d para los frascos incubados a 4°C y 8°C y las 8 h, 1, 2 y 3 d de incubación para los frascos a 20°C. Se determinó el pH y se efectuaron recuentos de *E. coli* y de microorganismos totales por duplicado. Una alícuota de la muestra de 0 h fue utilizada para un posterior ensayo de actividad lactoperoxidasa y de tiocianato.

2.1.6. Efecto del sistema lactoperoxidasa en leche de cabra sobre algunos microorganismos patógenos (*Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*)

2.1.6.1. Sobre *Listeria monocytogenes*

Se ha estudiado el efecto del sistema lactoperoxidasa sobre el comportamiento de tres cepas de *L. monocytogenes* (Scott A, Ohio 5069 y NCTC 11994) inoculadas individualmente en leche cruda de cabra de baja contaminación, durante 10 d a temperaturas de refrigeración (4°C y 8°C) y 3 d a temperatura ambiente (20°C). Los experimentos se realizaron por duplicado.

Se utilizó leche obtenida según lo indicado en el apartado 2.1.5.1.

Las cepas de *L. monocytogenes* fueron inoculadas individualmente en frascos estériles con 100 ml de leche antes de la activación del sistema lactoperoxidasa. La concentración final de *L. monocytogenes* fue de aproximadamente 10⁴ ufc/ml de leche.

La activación del sistema lactoperoxidasa se efectuó según lo indicado en el apartado 2.1.3. Los frascos fueron incubados a 4°C, 8°C y 20°C.

Se tomaron muestras a las 0 h, antes de la inoculación y de la activación del sistema lactoperoxidasa, a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 d para los frascos incubados a 4°C y 8°C y a las 8 h, 1, 2 y 3 d para los frascos incubados a 20°C. Se determinó el pH y se efectuaron determinaciones de *L. monocytogenes* y de

microorganismos totales por duplicado. Una alícuota de la muestra de 0 h fue utilizada para un posterior ensayo de actividad lactoperoxidasa y de tiocianato.

2.1.6.2. Sobre *Staphylococcus aureus*

Se ha estudiado el efecto del sistema lactoperoxidasa sobre el comportamiento de *Staph. aureus* en leche cruda de cabra de baja contaminación, durante 7 d a temperaturas de refrigeración (4°C y 8°C) y 3 d a temperatura ambiente (20°C). Los experimentos se realizaron por duplicado.

Se utilizó leche obtenida según lo indicado en el apartado 2.1.5.1.

El inóculo consistió en una mezcla de los cultivos de tres cepas de *Staph. aureus*, previamente aisladas a partir de leche de cabra y que no mostraron inhibición cruzada. La concentración final de *Staph. aureus* fue de aproximadamente 10⁴ ufc/ml de leche.

La activación del sistema lactoperoxidasa se efectuó según lo indicado en el apartado 2.1.3. Los frascos fueron incubados a 4°C, 8°C y 20°C.

Se tomaron muestras a las 0 h, antes de la inoculación y de la activación del sistema lactoperoxidasa, a los 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 d para 4°C y 8°C y a las 8 h, 1, 2 y 3 d para 20°C. Se determinó el pH y se efectuaron determinaciones de *Staph. aureus* y de microorganismos totales por duplicado. Una alícuota de la muestra de 0 h fue utilizada para un posterior ensayo de actividad lactoperoxidasa y de tiocianato.

2.2. METODOLOGÍA EMPLEADA

2.2.1. Análisis microbiológicos

2.2.1.1. Diluciones decimales de la leche

Para obtener la dilución 10^{-1} se pasó 1 ml de leche a un tubo con 9 ml de agua peptonada estéril al 0.1%. Las diluciones sucesivas se realizaron pasando 1 ml de la dilución anterior a un tubo con 9 ml de agua peptonada estéril al 0.1%.

2.2.1.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo y métodos de análisis utilizados para los distintos grupos microbianos fueron los siguientes:

Totales viables

Se determinaron en Plate Count Agar (American Public Health Association, 1978).
Temperatura/tiempo de incubación: 30°C/72 h.

Siembra: 0.0492 ml en espiral (Spiral System, Interscience, Saint Nom-La Breteche, Francia).

Se cuenta toda la placa o sectores, según la cantidad de colonias.

Psicrotrofos Gram negativos

Se determinaron en Plate Count Agar adicionado con 100 UI/ml de penicilina G (Richard, 1981).

Temperatura/tiempo de incubación: 7°C/10 d.

Siembra: 0.0492 ml en espiral.

Se cuenta toda la placa o sectores, según la cantidad de colonias.

Gram negativos

Se determinaron en Gram Negative PMK agar (Plate Count Monensin KCl, Biolife, Milan, Italia).

Temperatura/tiempo de incubación: 30°C/24 h.

Siembra: 0.0492 ml en espiral.

Se cuenta toda la placa o sectores, según la cantidad de colonias.

Estafilococos

Se determinaron en agar ETGPA (Egg Yolk Tellurite Glycine Piruvate Agar, Difco, Detroit, Michigan, EEUU) (Baird-Parker, 1979).

Temperatura/tiempo de incubación: 37°C/48 h.

Siembra: 0.0492 ml en espiral.

Se cuentan las colonias de color negro brillante.

Enterobacteriáceas

Se determinaron en agar VRBA (Violet Red Bile Agar, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) (American Public Health Association, 1978), adicionado con un 1% de glucosa (VRBGA) (Mossel et al., 1962).

Temperatura/tiempo de incubación: 37°C/24 h.

Siembra: 1 ml en placa en profundidad, con doble capa del mismo medio.

Se cuentan las colonias de color rojo oscuro con diámetro igual o superior a 0.5 mm.

Coliformes

Se determinaron en VRBA.

Temperatura/tiempo de incubación: 37°C/24 h.

Siembra: 1 ml en placa en profundidad, con doble capa del mismo medio.

Se cuentan las colonias de color rojo oscuro con diámetro igual o superior a 0.5 mm.

Coliformes fecales

Se determinaron en VRBA.

Temperatura/tiempo de incubación: 45°C/24 h.

Siembra: 1 ml en placa en profundidad, con doble capa del mismo medio.

Se cuentan las colonias de color rojo oscuro con diámetro igual o superior a 0.5 mm.

Brucella

Se determinó en medio selectivo de *Brucella* spp. (Oxoid), adicionado con suplemento antibiótico para el aislamiento selectivo de *Brucella* spp. (Oxoid), previamente incubado a 37°C/10-15 min, y adicionado con suero de caballo inactivado a 56°C/30 min (Oxoid).

Temperatura/tiempo de incubación: 37°C/7-10 d en atmósfera de CO₂ (BBL GasPak CO₂ System, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, EEUU).

Siembra: 0.0492 ml en espiral.

Se determinó la presencia o ausencia de colonias semejantes a gotas de rocío.

Listeria

Se determinó en medio selectivo de *Listeria* spp. adicionado con suplemento selectivo de *Listeria* spp. (formulación Oxford, Oxoid).

Temperatura/tiempo de incubación: 37°C/48 h.

Siembra: 0.0492 ml en espiral.

Se determinó la presencia o ausencia de colonias negras con el centro hundido y aplanadas sobre el agar.

2.2.1.3. Detección de estafilococos coagulasa positivos

Se aislaron 10 colonias por cada muestra a partir de las placas de agar ETGPA. Los aislamientos fueron sembrados en caldo BHI (Brain Heart Infusion, Difco), e incubados a 37°C/24 h.

Se realizó el test de la coagulasa (Baird-Parker, 1979) poniendo en un tubo de ensayo de 7 mm por 100 mm, 0.5 ml de plasma de conejo (Coagulase Plasme EDTA, Difco), al cual se añadieron 2 ó 3 gotas de cultivo. Los tubos se incubaron a 37°C durante 4 h. La coagulación del plasma indica la presencia de coagulasa.

2.2.1.4. Detección de *Listeria* spp. mediante sondas de hibridación de DNA

Se utilizó el Gene-Trak *Listeria* Assay (Gene-Trak Systems, Framingham, Massachusetts, EEUU). De cada muestra de leche se añadieron 25 ml a 225 ml de caldo de enriquecimiento PEB (Phosphated Buffered *Listeria* Enrichment Broth, Gene-Trak Systems) y se incubó durante 24 h a 30°C.

Pasado el tiempo de incubación, se empapó una torunda en cada frasco de PEB, para recoger la mayor cantidad de medio. Seguidamente se sembró con la torunda la superficie de una placa de medio LCA (Lithium Chloride Ceftazidime Agar, Gene-Trak Systems), y se incubó durante 24 h a 37°C.

A las 24 h, se recogió con una torunda la mayor cantidad de cultivo crecido posible, resuspendiéndose en un tubo con 1 ml de PBS (Phosphate Buffered Saline,

Gene-Trak Systems) estéril, mediante rotación de la torunda durante 5 seg en el líquido. Se recuperó la máxima cantidad de líquido, antes de desechar la torunda.

Sobre 0.5 ml de esta resuspensión del cultivo se realizó el ensayo Gene-Trak, siguiendo el protocolo del fabricante.

2.2.2. Aislamiento e identificación de *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *Staphylococcus aureus* a partir de leche cruda de cabra

2.2.2.1. *Escherichia coli*

Se procedió al aislamiento de varias colonias de color rojo oscuro, con diámetro igual o superior a 0.5 mm, a partir de placas de VRBA que habían sido incubadas durante 24 h a 45°C, correspondientes a varias muestras de leche cruda de cabra. Dichas colonias fueron sembradas en estría de YGA (agar glucosa extracto de levadura) con la siguiente formulación:

Extracto de levadura	5 g
Extracto de carne	5 g
Peptona	5 g
Glucosa	5 g
Fosfato disódico	5 g
Agua destilada	1 l

Los aislamientos fueron incubados durante 24 h a 37°C y purificados en placas del mismo medio.

Se realizaron las siguientes pruebas de identificación:

Morfología: Se comprobó en preparación en fresco a partir de estrías en YGA incubadas a 37°C/24h.

Tinción de Gram: Se realizó a partir de estrías en YGA incubadas a 37°C/24h.

Producción de catalasa: Se comprobó en un porta con una gota de H_2O_2 de 10 volúmenes a la que se añadió una masa de cultivo celular crecido durante 24 h en agar YGA. La producción de burbujas indica presencia de catalasa.

Presencia de citocromo oxidasa: Se determinó según el método de Kovacks (1956). Se impregnó un papel de filtro con una solución de N, N, N', N', tetrametil 1-4 fenilendiamonio dicloruro en agua al 1% sobre el que se depositaron células de un cultivo de 24 h de la cepa en estudio. La aparición de un color azul-violeta intenso, en menos de 10 seg, indica la presencia de citocromo oxidasa.

Utilización de citrato como única fuente de carbono: Se comprobó en estrías de Simmons Citrate Agar (Difco). La incubación transcurrió a 37°C durante 1-7 d. La utilización de citrato conduce a una alcalinización del medio, virando el indicador a azul.

Producción de H_2S : En picaduras de Kligler Iron Agar (Difco) incubadas a 37°C durante 24 h. La producción de H_2S se manifiesta por un ennegrecimiento del medio.

Producción de indol: Se determinó en agua con triptona al 2% (p/v). Después de incubar a 37°C durante 24 h, se añadió a cada tubo unas gotas de reactivo de Kovacks. La formación de un anillo color rojo en la superficie del tubo indica la presencia de indol. El reactivo de Kovacs se preparó de la siguiente manera:

Paradimetilaminobenzaldehido	5 g
Alcohol amílico	75 ml
Acido clorhídrico	25 ml

Se disolvió el aldehido en alcohol en un baño a 60°C y, tras enfriamiento, se añadió el ácido clorhídrico gota a gota.

Reacción del rojo de metilo: Se determinó en caldo glucosa fosfato (Harrigan & Mc Cance, 1976) incubado durante 48 h a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se añadieron al cultivo unas gotas de reactivo de rojo de metilo al 0.5% en etanol de 60°. La aparición de color rojo al cabo de unos segundos se interpreta como prueba positiva.

Prueba de Voges Proskauer: Se efectuó en caldo glucosa fosfato incubado durante 48 h a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se añadieron al cultivo unas gotas de α -naftol en solución etanólica al 6% seguido de unas gotas de KOH al 16%. La presencia de acetoína se manifiesta por la aparición de un anillo rojo en la superficie del cultivo.

Los bacilos Gram negativos, catalasa positivos, citocromo oxidasa negativos, citrato negativos, no productores de H₂S, indol y rojo de metilo positivos y Voges Proskauer negativos se seleccionaron como *E. coli*.

2.2.2.2. *Pseudomonas fluorescens*

Se procedió al aislamiento de varias colonias a partir de placas de Plate Count Agar con penicilina incubadas durante 10 d a 7°C, correspondientes a varias muestras de leche cruda de cabra. Las colonias fueron sembradas en estrías de TSA (Trypticase Soy Agar, BBL), incubadas durante 24 h a 30°C y purificadas en placas del mismo medio.

Se procedió a su examen morfológico, tinción de Gram, producción de catalasa, presencia de citocromo oxidasa, según lo indicado en el apartado 2.2.2.1. y se examinó la producción de fluorescencia en medio de King B (King et al., 1954).

Fluorescencia en medio King B: Se prepararon placas del medio de King B de la siguiente formulación:

Proteosa peptona	20 g
K ₂ HPO ₄	1.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5 g
Glicerol	10 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 l

Las placas fueron inoculadas en zig-zag con los aislamientos e incubadas 48 h a 30°C. La fluorescencia se detectó tras la observación bajo luz ultravioleta.

Los bacilos Gram negativos, catalasa positivos, citocromo-oxidasa positivos y productores de fluorescencia en el medio de King B fueron seleccionados como *Ps. fluorescens*.

2.2.2.3. *Staphylococcus aureus*

Se procedió al aislamiento de varias colonias, de color negro brillante, a partir de placas de agar ETGPA incubadas durante 48 h a 37°C, de varias muestras de leche cruda de cabra. Dichas colonias fueron sembradas en estrías de TSA e incubadas durante 24 h a 37°C. La purificación se efectuó en placas del mismo medio.

Se realizó su examen morfológico, tinción de Gram y producción de catalasa según lo indicado en 2.2.2.1. Se examinó, además, la producción de coagulasa según lo indicado en 2.2.1.3. y la producción de termonucleasa de los cultivos previamente seleccionados.

Examen de la actividad termonucleasa: Se determinó a partir de los sobrenadantes de los cultivos obtenidos según Donnelly et al. (1967). Las cepas fueron cultivadas en frascos de 250 ml de capacidad, en los que se introdujo un tubo de diálisis con 100 ml de caldo BHI de doble concentración. Tras su esterilización se añadieron 18 ml de solución fisiológica tamponada con fosfato estéril (0.02M) sobre la que se inoculó el cultivo. El inóculo se preparó a partir de un cultivo sobre agar YGA incubado 24 h a 37°C. Se incubó 24 h a 37°C en agitación. El cultivo concentrado se centrifugó 10 min a 39000 g.

La actividad termonucleasa se determinó en DNase Test Agar (Difco) según Ibrahim (1981). El medio fue hervido 20 min y enfriado a 47°C. La pérdida de peso se ajustó con agua destilada y 3 ml de azul de toluidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU) 0.1M. El medio se dispensó en volúmenes pequeños y se guardó a temperatura ambiente. Para su reutilización se fundió y se pipetearon 5.5 ml de medio a placas Petri de 9 cm de diámetro. Se enfriaron a 4°C y se practicaron pocillos de 5.5 mm de diámetro. Se calentaron las placas a 50°C y se eliminó el líquido sobrante de los pocillos a los que se añadieron 30 µl de sobrenadante. Las placas fueron cubiertas con parafilm para evitar el exceso de evaporación durante la incubación a 50°C/4 h. La formación de halos color rosa alrededor de los pocillos indica la presencia de actividad termonucleasa en el sobrenadante del cultivo.

Se seleccionaron como *Staph. aureus* los aislamientos con morfología de cocos, Gram positivos, catalasa positivos y productores de coagulasa y termonucleasa.

2.2.3. Preparación de inóculos para los ensayos de inhibición por el sistema lactoperoxidasa

Se comprobó en primer lugar la ausencia de inhibición entre las tres cepas seleccionadas de cada especie mediante una siembra en líneas cruzadas en la superficie de placas de los medios adecuados.

Las tres cepas de *E. coli* se sembraron individualmente en caldo YG y se incubaron durante 24 h a 37°C. Seguidamente se realizó una resiembra a 20°C durante 48 h, tras lo cual el cultivo se encontraba en las condiciones adecuadas para iniciar el experimento.

El inóculo de *Ps. fluorescens* se preparó sembrando las tres cepas individualmente en medio TSB que se incubó durante 24 h a 30°C. Se realizó otra resiembra a TSB y se incubó durante 48 h a 20°C, tras lo cual el cultivo se encontraba en las condiciones adecuadas para iniciar el experimento.

El inóculo de *Staph. aureus* se preparó sembrando las tres cepas individualmente en medio TSB que se incubó durante 24 h a 37°C, realizándose una resiembra en el mismo medio con incubación a 20°C durante 48 h.

Una vez crecidas las tres cepas de cada especie, se mezclaron y se prepararon las diluciones adecuadas para que al sembrar la leche estéril se obtuviesen aproximadamente 10⁴ ufc/ml.

El inóculo de *L. monocytogenes* se preparó en TSB con el 0.6% de extracto de levadura, incubado durante 24 h a 37°C, realizándose una resiembra en el mismo medio con incubación a 20°C durante 48 h.

2.2.4. Análisis químicos

2.2.4.1. Ensayo de la actividad lactoperoxidasa

La actividad lactoperoxidasa se determinó por duplicado según Marshall et al. (1986), siguiendo la oxidación de ABTS (ácido 2,2'-azinodi-3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico, Sigma) a 412 nm. Para ello, se añadieron 30 μ l de leche o de una dilución adecuada en tampón acetato 0.1 M (pH 4.5) a 2.95 ml de una solución 1 mM de ABTS en tampón acetato, previamente dispuesto en una cubeta de 3 ml de capacidad. Tras mezclar, se añadieron 30 μ l de una solución 10 mM de peróxido de hidrógeno, en tampón acetato.

La oxidación del ABTS se siguió mediante la determinación de los valores de absorbancia a 412 nm, durante 5 min, utilizando un espectrofotómetro Beckman DU 7.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de un micromol de sustrato (ABTS) por minuto, a 20°C en tampón acetato 0.1M a una concentración de ABTS 1mM y H₂O₂ 0.1 mM, y es equivalente a un cambio en la absorbancia a 412 nm de 32.4 por minuto (Shindler et al., 1976).

Se calculó la pendiente de la recta de regresión obtenida de los valores de absorbancia durante los 5 min de reacción, a partir de la cual se obtuvo la actividad lactoperoxidasa en U/ml, siendo el coeficiente de extinción molar del producto de oxidación del ABTS de 32400 M⁻¹ cm⁻¹ (Shindler et al., 1976).

2.2.4.2. Determinación de tiocianato

El ión tiocianato se determinó utilizando el reactivo férrico (Fe³⁺) de Sörbo (1953). La preparación del reactivo consiste en mezclar 16 g de Fe(NO₃)₃·9H₂O con 50 ml de HNO₃ 2M. La leche se desproteinizó mezclando 6 ml con 3 ml de ácido tricloroacético al 20%. A los 30 min se efectuó la filtración de las muestras utilizando filtros Whatman 40, se mezclaron 1.5 ml de filtrado con 1.5 ml del reactivo, y se midió la formación del complejo férrico coloreado a 460 nm, utilizando un espectrofotómetro Beckman DU 7.

La concentración de tiocianato se calculó a partir de una curva patrón preparada con las siguientes concentraciones de tiocianato sódico: 1, 5, 10, 15, 20 y 25 ppm.

2.2.5. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en las distintas experiencias se sometieron a análisis de varianza mediante los programas BMD07D y BMD08V (Sigstat, Provo, UT, EEUU). Los análisis de regresión se efectuaron utilizando los programas Curve y Regress (Sigstat). Las comparaciones de medias se realizaron mediante los tests LSD y Tukey (Steel & Torrie, 1980).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE DE CABRA

3.1.1. Niveles de los principales grupos microbianos

Se ha estudiado la calidad microbiológica de la leche de cabra sobre un total de 83 muestras de leche recogidas durante las cuatro estaciones del año, procedentes de un total de 15 ganaderos de la provincia de Ávila, efectuando dos muestreos por estación.

El valor medio del pH de las 83 muestras de leche de cabra recogidas durante las cuatro estaciones fue de 6.83, con una desviación típica de 0.12 y un intervalo de variación de 6.59-7.26.

La temperatura de la leche, tomada en el momento de la recogida de las muestras, osciló entre 4°C y 36°C.

Se detectó la presencia de peróxido de hidrógeno en cuatro muestras correspondientes a la estación de verano y a cuatro ganaderos diferentes, con las siguientes concentraciones: 0.5, 0.5, 2.0 y 5.0 ppm.

La Tabla 1 muestra las medias, las desviaciones típicas y los intervalos de variación de los grupos microbianos estudiados en la leche de cabra, durante todo el año, sobre el total de 83 muestras. Los niveles de microorganismos totales viables dieron una media de 5.61 unidades logarítmicas, con una variación que osciló entre 3.30 y 7.78 log ufc/ml. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores, que dan cuenta de una gran variación de los niveles de totales desde 10^4 hasta 10^7 ufc/ml (Varo et al., 1977). La media encontrada no llega al valor de 2.0×10^6 ufc/ml obtenido por Barbosa & Miranda (1986). En leche recién ordeñada de oveja se han encontrado niveles de microorganismos totales frecuentemente superiores a 10^6 ufc/ml y de 10^7 ufc/ml en leche a su llegada a la industria (Nuñez et al., 1984).

La Comunidad Económica Europea ha publicado recientemente la normativa microbiológica para la leche cruda de cabra, estableciendo límites máximos de 1×10^6 ufc/ml para la leche destinada a la producción de leche tratada térmicamente o a la

Tabla 1. Niveles* de los principales grupos microbianos de la leche de cabra.

Grupo microbiano	Media	SD	Intervalo
Totales viables	5.61	1.15	3.30-7.78
Gram negativos	3.91	1.40	1.30-6.83
Psicrotrofos Gram negativos	2.83	1.19	1.30-4.98
Estafilococos	4.18	0.71	2.70-6.66
Estafilococos coagulasa +	2.67	1.36	1.30-6.15
Enterobacteriáceas	2.82	1.25	1.00-5.81
Coliformes	2.80	1.23	1.00-5.38
Coliformes fecales	2.37	1.14	1.00-5.40

* Valores medios obtenidos a partir de 83 muestras, por duplicado, correspondientes a 15 ganaderos y recogidas durante las cuatro estaciones, expresados en log ufc/ml.

elaboración de productos a base de leche tratada térmicamente, y de 5×10^5 ufc/ml para la leche destinada a la elaboración de productos a base de leche cruda (Directiva 92/46/CEE, Diario de la Comunidad Europea N° L 268, 14 Sept. 1992). De acuerdo con nuestros resultados, un 60% de las muestras analizadas presentaron niveles de microorganismos totales $\leq 10^6$ ufc/ml y un 54% niveles $\leq 5 \times 10^5$ ufc/ml.

Excluyendo las bacterias lácticas, el grupo predominante de microorganismos resultó ser el de los estafilococos, con una media de 4.18 unidades logarítmicas y una variación de 2.70-6.66 log ufc/ml. Otros autores han encontrado una variación menor de los niveles de estafilococos: 5.4×10^2 - 4.9×10^4 ufc/ml (Chubb & Orchard, 1985). Bautista et al. (1986) comprobaron niveles medios de 5.9×10^4 estafilococos/ml en leche de oveja a su llegada a la industria, siendo dichos niveles 200 veces más bajos en leche recién ordeñada.

Los estafilococos coagulasa positivos dieron valores altos, con una media de 2.67 log ufc/ml y un intervalo de 1.30-6.15 log ufc/ml. Un 43% de las muestras, 36 de las 83 ensayadas, tenían estafilococos coagulasa positivos, proporción cercana a la encontrada por Barbosa & Miranda (1986) y por Mariscal (1987). En leche cruda de oveja, Bautista et al. (1986) encontraron un 31% de cepas coagulasa positivas entre los aislamientos de estafilococos.

Los recuentos medios en agar PMK correspondientes a microorganismos Gram negativos ascendieron a un valor de 3.91 log ufc/ml. Podría deducirse de este dato que la flora Gram positiva, fundamentalmente la flora láctica, es mayoritaria en la leche cruda de cabra.

Los niveles de psicrotrofos Gram negativos detectados fueron de 2.83 log ufc/ml, con un intervalo de 1.30-4.98 log ufc/ml, más bajos que los valores de 3.0×10^2 - 1.7×10^7 ufc/ml detectados por Varo et al. (1977), y mucho más bajos que los 10^6 ufc/ml encontrados en leche de oveja a su llegada a la industria por Nuñez et al. (1984).

Las enterobacteriáceas, coliformes y coliformes fecales se han encontrado en los siguientes niveles medios, respectivamente: 2.82 log ufc/ml, 2.80 log ufc/ml y 2.37 log ufc/ml. Aunque hubo muestras con niveles muy bajos de estos microorganismos, otras alcanzaron valores de 5.81 log ufc/ml de enterobacteriáceas, 5.38 log ufc/ml de coliformes y 5.40 log ufc/ml de coliformes fecales, resultados

que están en la línea de los altos valores ofrecidos para estos grupos por Varo et al. (1977). En el 48% de los casos se detectó la presencia de *E. coli*, proporción cercana a la obtenida por otros autores (Barbosa & Miranda, 1986; Jensen & Hughes, 1980). Resultados similares han sido obtenidos en muestras de leche de oveja recogidas en granjas por Gaya et al. (1987).

No se detectó la presencia de *Brucella* spp. ni de *Listeria* spp. en ninguna de las muestras analizadas.

L. monocytogenes ha sido aislada de un 0.8% de muestras de leche de cabra de Inglaterra y Gales por Greenwood et al. (1991). De un total de 208 muestras de leche de cabra procedentes de 115 ganaderos de Castilla-León, se aisló *L. monocytogenes* de la leche procedente de 18 ganaderos y *L. innocua* de la leche procedente de 13 ganaderos (Gaya et al., datos no publicados).

3.1.2. Variación estacional

Todos los grupos microbianos estudiados alcanzaron sus niveles máximos en verano y sus niveles mínimos generalmente en invierno.

La oscilación de la temperatura de las muestras de leche en las distintas estaciones fue la siguiente: 22°C-36°C (verano), 7°C-34°C (otoño), 4°C-30°C (invierno) y 17°C-34°C (primavera).

Los niveles de los principales grupos microbianos en las distintas estaciones se muestran en las Tablas 2, 3, 4 y 5, para verano, otoño, invierno y primavera, respectivamente y su variación estacional en las Figuras 1, 2 y 3.

Los valores medios del pH en las cuatro estaciones se recogen en la Tabla 6. El pH de las muestras de verano resultó significativamente ($P < 0.001$) inferior al detectado en invierno. Los valores de pH de las muestras de verano, primavera y otoño no resultaron significativamente diferentes entre sí.

La media de los niveles de microorganismos totales en las cuatro estaciones fue la siguiente: 6.28 log ufc/ml (verano), 5.61 log ufc/ml (otoño), 5.09 log ufc/ml (invierno) y 5.36 log ufc/ml (primavera). Los niveles más elevados se obtuvieron en las muestras de verano, seguidos de otoño, primavera e invierno. Se comprobó

Tabla 2. Niveles* de los principales grupos microbianos en la leche de cabra durante el verano.

Grupo microbiano	Media	SD	Intervalo
Totales viables	6.28	0.99	4.30-7.81
Gram negativos	4.90	1.27	2.30-6.83
Psicrotrofos Gram negativos	2.75	1.27	1.30-4.89
Estafilococos	4.47	0.69	3.08-5.64
Estafilococos coagulasa +	3.56	1.29	1.30-5.60
Enterobacteriáceas	3.59	1.32	1.00-5.81
Coliformes	3.50	1.26	1.00-5.38
Coliformes fecales	3.08	1.30	1.00-5.40

* Valores medios obtenidos a partir de 24 muestras, por duplicado, expresados en log ufc/ml.

Tabla 3. Niveles* de los principales grupos microbianos en la leche de cabra durante el otoño.

Grupo microbiano	Media	SD	Intervalo
Totales viables	5.61	1.01	3.30-7.23
Gram negativos	3.68	1.18	1.30-5.68
Psicrotrofos Gram negativos	3.01	1.02	1.30-4.34
Estafilococos	4.27	0.54	3.15-5.49
Estafilococos coagulasa +	2.25	1.10	1.30-4.42
Enterobacteriáceas	2.54	1.04	1.00-4.90
Coliformes	2.62	1.05	1.00-4.79
Coliformes fecales	2.26	1.07	1.00-4.34

* Valores medios obtenidos a partir de 19 muestras, por duplicado, expresados en log ufc/ml.

Tabla 4. Niveles* de los principales grupos microbianos en la leche de cabra durante el invierno.

Grupo microbiano	Media	SD	Intervalo
Totales viables	5.09	0.93	3.30-6.89
Gram negativos	3.25	1.48	1.30-5.91
Psicrotrofos Gram negativos	3.01	1.28	1.30-4.99
Estafilococos	3.75	0.41	2.61-4.64
Estafilococos coagulasa +	2.30	1.13	1.30-4.32
Enterobacteriáceas	2.06	0.91	1.00-4.04
Coliformes	2.05	0.91	1.00-3.95
Coliformes fecales	1.72	0.74	1.00-3.11

* Valores medios obtenidos a partir de 21 muestras, por duplicado, expresados en log ufc/ml.

Tabla 5. Niveles* de los principales grupos microbianos en la leche de cabra durante la primavera.

Grupo microbiano	Media	SD	Intervalo
Totales viables	5.36	1.33	3.30-7.68
Gram negativos	3.60	1.03	1.30-5.48
Psicrotrofos Gram negativos	2.56	1.20	1.30-4.66
Estafilococos	4.23	0.92	3.08-6.68
Estafilococos coagulasa +	2.37	1.47	1.30-6.15
Enterobacteriáceas	2.99	1.15	1.00-5.08
Coliformes	2.91	1.21	1.00-4.98
Coliformes fecales	2.29	0.91	1.00-4.48

* Valores medios obtenidos a partir de 19 muestras, por duplicado, expresados en log ufc/ml.

Tabla 6. Valores* del pH de la leche de cabra en las distintas estaciones.

Estación	Media	SD
Verano	6.79	0.07
Otoño	6.81	0.07
Invierno	6.97	0.11
Primavera	6.74	0.07

* Valores medios obtenidos a partir de 83 muestras.

Figura 1. Variación estacional de totales viables, Gram negativos y psicrotrofos Gram negativos en la leche de cabra.

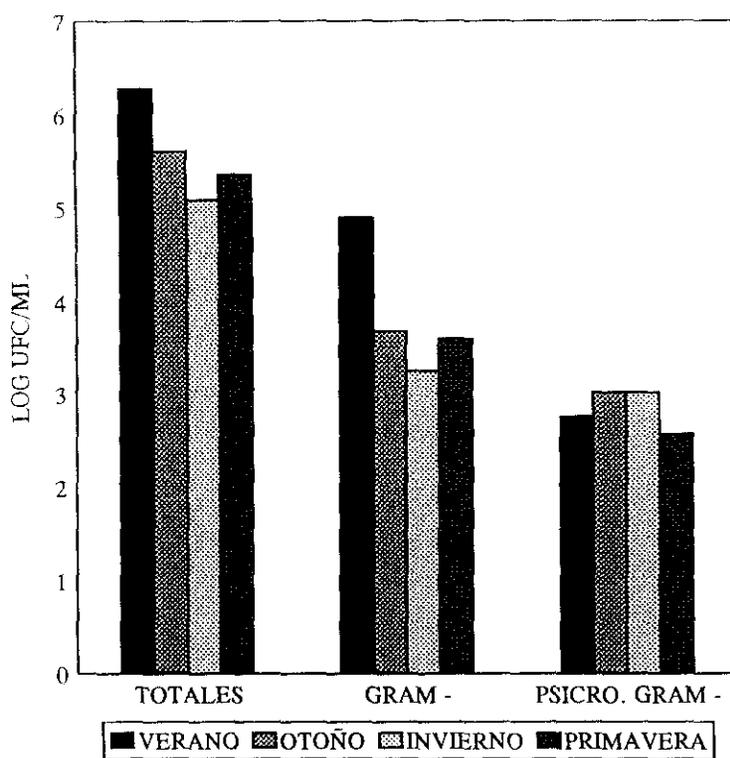


Figura 2. Variación estacional de estafilococos y estafilococos coagulasa positivos en la leche de cabra.

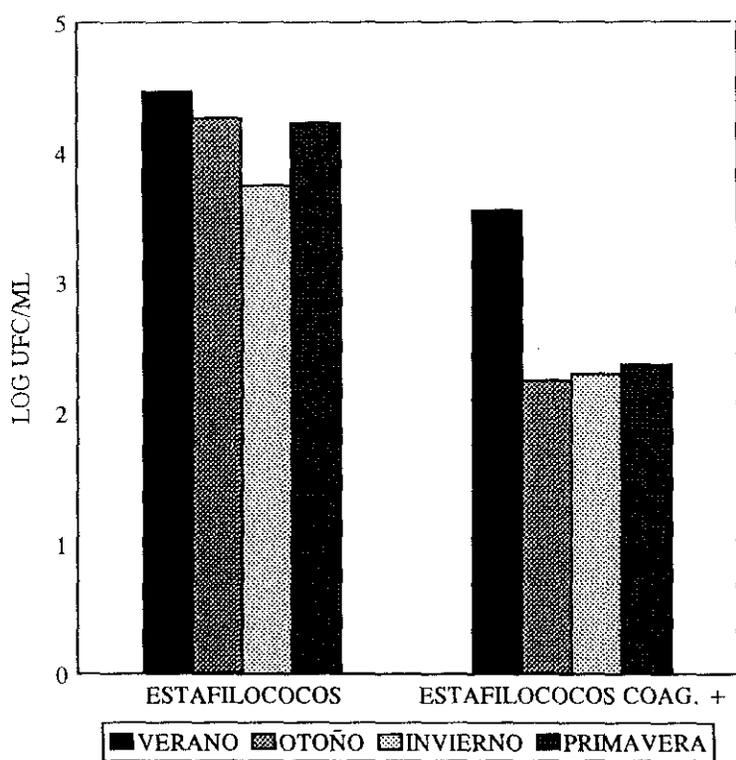
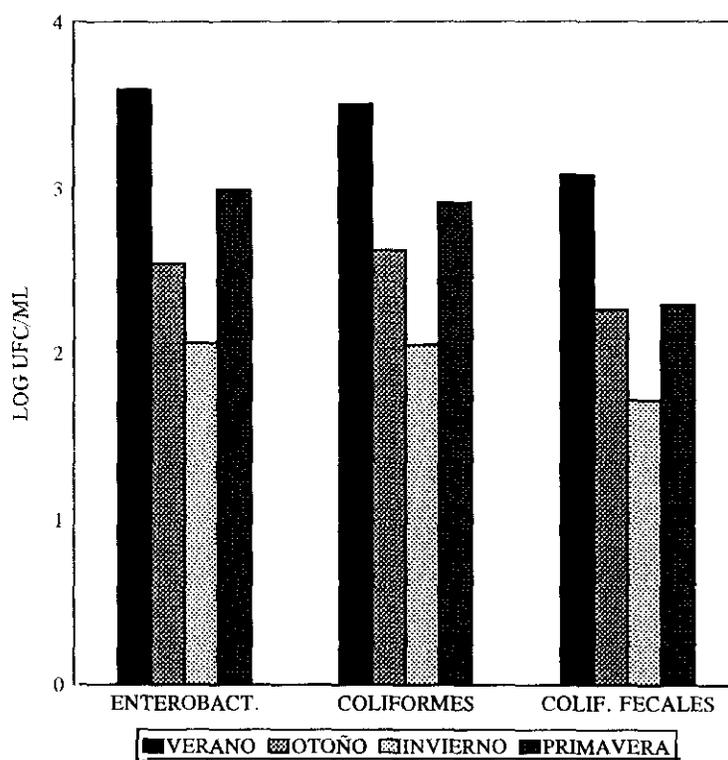


Figura 3. Variación estacional de enterobacteriáceas, coliformes y coliformes fecales en la leche de cabra.



la influencia significativa ($P < 0.01$) del efecto estación sobre el nivel de microorganismos totales en la leche, tras realizar el análisis de varianza. Los niveles de totales en verano resultaron significativamente más elevados que los de otoño ($P < 0.001$), primavera ($P < 0.001$) e invierno ($P < 0.001$). Bautista et al. (1986), estudiando la variación estacional de los microorganismos totales en leche de oveja recién ordeñada, comprobaron que los niveles más elevados de microorganismos totales se detectaban en otoño, siendo significativamente superiores a los obtenidos en verano e invierno. Estos autores atribuyen sus resultados al empleo de H_2O_2 en verano para conservar la leche y al descuido en otoño de las prácticas higiénicas en la granja, asociado al descenso de la producción de leche.

Los microorganismos Gram negativos siguen la misma tendencia que los totales con los siguientes valores: 4.90 log ufc/ml (verano), 3.68 log ufc/ml (otoño), 3.25 log ufc/ml (invierno) y 3.60 log ufc/ml (primavera). Se detectaron diferencias significativas ($P < 0.001$) entre estaciones, siendo los niveles de verano significativamente superiores a los de otoño ($P < 0.001$), primavera ($P < 0.001$) e invierno ($P < 0.001$).

El grupo de los psicrotrofos Gram negativos sigue una variación diferente al presentar niveles más altos de bacterias en otoño e invierno (3.01 log ufc/ml) y niveles más bajos en verano y primavera (2.75 y 2.56 log ufc/ml respectivamente). Sin embargo, en los psicrotrofos Gram negativos no se detectaron diferencias significativas entre las cuatro estaciones tras realizar el análisis de varianza correspondiente.

Los estafilococos siguen una evolución similar a la de la flora total durante las cuatro estaciones. Se comprobó la existencia de diferencias significativas ($P < 0.05$) entre estaciones, con los valores más altos en los meses de verano, significativamente superiores a los de otoño ($P < 0.001$), primavera ($P < 0.001$) e invierno ($P < 0.001$). En leche de oveja, la variación estacional de los estafilococos siguió la tendencia indicada anteriormente para microorganismos totales, con los niveles más altos en otoño, significativamente más elevados que los detectados en invierno, verano y primavera (Bautista et al. 1986).

Los niveles de estafilococos coagulasa positivos también resultaron influidos ($P < 0.01$) por la estación, con valores significativamente más elevados en los meses de verano que en otoño ($P < 0.01$), primavera ($P < 0.01$) e invierno ($P < 0.001$).

Las enterobacteriáceas, coliformes y coliformes fecales muestran igualmente los valores máximos en verano (3.59 log ufc/ml, 3.50 log ufc/ml y 3.08 log ufc/ml respectivamente), mientras que el invierno es la estación que presenta los niveles mínimos (2.06 log ufc/ml de enterobacteriáceas, 2.05 log ufc/ml de coliformes y 1.72 log ufc/ml de coliformes fecales). En el caso de las enterobacteriáceas y de los coliformes, los niveles de bacterias son mayores en la primavera (2.99 y 2.91 log ufc/ml respectivamente) que en el otoño (2.54 log ufc/ml y 2.62 log ufc/ml, respectivamente). Los niveles de enterobacteriáceas en las muestras de leche de verano resultaron significativamente más elevados que en invierno ($P < 0.01$) y otoño ($P < 0.05$), mientras que no diferían significativamente de los detectados en primavera. Resultados similares se obtuvieron con los coliformes y los coliformes fecales en cuanto a su variación estacional, con valores significativamente más elevados en verano que en invierno ($P < 0.001$) y otoño ($P < 0.05$), y que no diferían significativamente de los niveles en primavera.

Los niveles de significación del efecto estación sobre los distintos grupos microbianos se recogen en la Tabla 7.

La variación estacional observada en el presente trabajo para microorganismos totales y otros grupos microbianos, con niveles máximos en los meses de verano, coincide con otros trabajos realizados con leche de vaca. Soler (1989) encuentra niveles logarítmicos medios de microorganismos totales de 6.52/ml en la leche de 990 granjas de Mallorca, así como la existencia de diferencias significativas entre estaciones, con los niveles máximos en verano y los mínimos en invierno.

La mayor contaminación microbiana en los meses de verano pueden atribuirse a las temperaturas más elevadas, que favorecen el crecimiento de los microorganismos en los utensilios de ordeño, especialmente en condiciones deficientes de higiene y desinfección.

Tabla 7. Nivel de significación del efecto estación sobre los distintos grupos microbianos en leche de cabra.

Grupo microbiano	Estación
Totales viables	**
Gram negativos	***
Psicrotrofos Gram negativos	NS
Estafilococos	*
Estafilococos coagulasa +	**
Enterobacteriáceas	***
Coliformes	**
Coliformes fecales	***

***, $P < 0.001$

** , $P < 0.01$

* , $P < 0.05$

NS, no significativo

3.2. EL SISTEMA LACTOPEROXIDASA EN LECHE DE CABRA

3.2.1. Componentes del sistema lactoperoxidasa en leche de cabra durante la lactación

3.2.1.1. Lactoperoxidasa

Se han estudiado los niveles de lactoperoxidasa en la leche de 10 cabras de un rebaño cruzado de razas múltiples, mediante diversas tomas de muestras a lo largo del período de lactación.

Los valores medios de lactoperoxidasa en los trece tiempos analizados se recogen en la Tabla 8, representándose su evolución en la Figura 4. Se detectaron niveles máximos de lactoperoxidasa de hasta 3.55 U/ml en una muestra de leche correspondiente a 75 d de lactación, mientras que los niveles más bajos correspondieron a las muestras tomadas en los primeros días después del parto. El valor medio total fue de 1.55 U/ml.

El valor medio de la actividad lactoperoxidasa en la leche de cabra fue superior al encontrado en leche de otras especies. Así, se han descrito valores de 1.4 U/ml en la leche de vaca (Stephens et al., 1979), 0.9 U/ml en la leche de búfala (Härnulf & Kandasamy, 1982) y 0.8 U/ml en la leche de oveja (Medina et al., 1989).

Mediante análisis de varianza, se detectaron efectos significativos de los individuos ($P < 0.001$) y del tiempo de lactación ($P < 0.001$) sobre los niveles de lactoperoxidasa (Tabla 9).

La evolución del contenido en lactoperoxidasa de la leche de cabra durante la lactación, tras realizar la comparación de medias correspondiente, fue la siguiente: los niveles de lactoperoxidasa fueron significativamente más bajos a las 0-24 h después del parto que a los 3 ($P < 0.001$), 7 ($P < 0.05$), 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 y 150 d ($P < 0.001$).

Los datos obtenidos para leche de cabra a lo largo del período de lactación no se ajustan a lo observado por Reiter (1985). Según este autor, el contenido de lactoperoxidasa es bajo en calostro bovino, aumentando rápidamente para alcanzar

Tabla 8. Niveles* de lactoperoxidasa (U/ml) en leche de cabra durante la lactación.

Días tras el parto	Lactoperoxidasa		
	Media	SD	Intervalo
0	0.50	0.30	0.08-1.00
3	1.63	0.58	0.80-2.39
7	1.26	0.41	0.53-1.92
15	1.24	0.43	0.65-1.89
30	1.71	0.65	0.69-2.73
45	1.74	0.64	0.59-2.93
60	1.82	0.53	0.82-2.74
75	1.91	0.82	1.01-3.55
90	1.77	0.89	0.66-3.37
105	1.74	0.94	0.04-2.85
120	1.78	0.80	0.57-2.80
135	1.35	0.75	0.05-2.37
150	1.67	0.81	0.52-2.89

* Valores medios sobre 10 cabras, con dos determinaciones por muestra.

Figura 4. Evolución de la actividad lactoperoxidasa en leche de cabra durante la lactación.

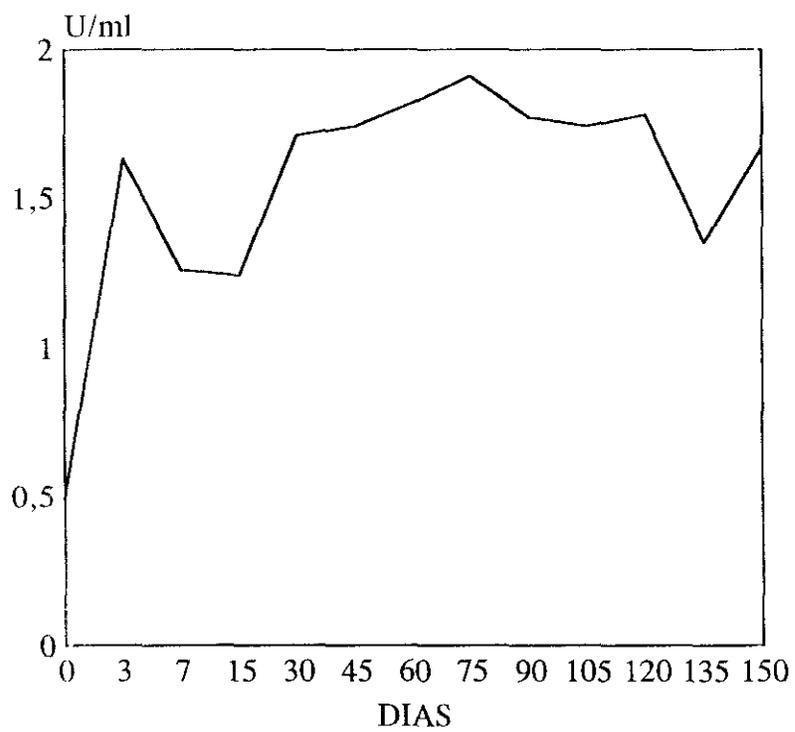


Tabla 9. Niveles de significación de los efectos individuo y tiempo de lactación sobre los componentes del sistema lactoperoxidasa.

Componentes del sistema	Individuo	Tiempo de lactación
Lactoperoxidasa	***	***
Tiocianato	***	***

*** $P < 0.001$

un máximo a los 4-5 d y descendiendo posteriormente a un nivel constante durante el resto de la lactación.

3.2.1.2. Tiocianato

Los niveles de tiocianato en leche de cabra a lo largo del período de lactación se recogen en la Tabla 10. Las concentraciones de tiocianato en la leche de cabra alcanzan una media de 4.03 ppm, variando en muestras individuales desde 0.67 hasta 11.17 ppm.

Se han detectado niveles de tiocianato en la leche de vaca de 3.2-4.6 ppm (Björck et al., 1979) y hasta de 15 ppm en la leche de vacas alimentadas con pastos naturales que contenían trébol (Reiter, 1985). Por otra parte, la media obtenida de los niveles de tiocianato en la leche de oveja fue de 10.3 ppm (Medina et al., 1989).

Los niveles de tiocianato relativamente bajos encontrados en la leche de cabra pueden deberse al régimen alimenticio del rebaño.

El análisis de varianza sobre los niveles de tiocianato detectó diferencias significativas entre individuos ($P < 0.001$) y entre días de lactación ($P < 0.001$) (Tabla 9).

3.2.2. Influencia de la raza, individuo y tiempo de lactación sobre los componentes del sistema lactoperoxidasa en leche de cabra

Se ha investigado la influencia de la raza sobre los componentes del sistema lactoperoxidasa en leche de cabra de dos razas de importancia económica en nuestro país: Verata y Murciano-Granadina. Dicho estudio se ha realizado sobre dos rebaños, uno de cada raza, de cada uno de los cuales se seleccionaron 10 cabras, cuyos niveles de lactoperoxidasa y tiocianato fueron evaluados en diversas tomas de muestras a lo largo del período de lactación.

3.2.2.1. Lactoperoxidasa

Los niveles de lactoperoxidasa en leche de cabra de las razas Verata y Murciano-Granadina durante la lactación se indican en las Tablas 11 y 12, respectivamente.

Tabla 10. Niveles* de tiocianato (ppm) en leche de cabra durante la lactación.

Días tras el parto	Tiocianato		
	Media	SD	Intervalo
0	5.62	2.12	2.91- 8.85
3	5.77	1.44	3.82- 8.17
7	7.30	2.43	2.88-11.17
15	8.09	1.96	3.94-10.03
30	3.87	1.43	2.08- 6.63
45	3.73	1.18	1.99- 5.66
60	4.79	1.13	3.32- 6.92
75	2.50	0.27	2.08- 2.80
90	2.15	0.29	1.71- 2.63
105	3.24	0.85	1.73- 4.38
120	1.91	0.27	1.64- 2.56
135	1.47	0.38	0.77- 2.11
150	1.93	0.63	0.67- 2.84

* Valores medios sobre 10 cabras, con dos determinaciones por muestra.

Tabla 11. Niveles* de lactoperoxidasa (U/ml) en leche de cabra Verata durante la lactación.

Días tras el parto	Lactoperoxidasa		
	Media	SD	Intervalo
0	0.03	0.11	0.00-0.46
3	0.93	0.88	0.01-2.46
7	1.23	0.64	0.40-2.80
15	0.59	0.36	0.05-1.12
30	0.81	0.40	0.09-1.23
45	0.73	0.33	0.28-1.37
60	0.63	0.23	0.30-1.04
75	0.82	0.39	0.01-1.53
90	1.00	0.37	0.68-1.87
105	1.41	0.27	0.96-1.93
120	1.24	0.28	0.88-1.74
135	1.46	0.34	0.67-1.92
150	1.44	0.30	0.73-1.82

* Valores medios sobre 10 cabras, con dos determinaciones por muestra.

Tabla 12. Niveles[†] de lactoperoxidasa (U/ml) en leche de cabra Murciano-Granadina durante la lactación.

Días tras el parto	Lactoperoxidasa		
	Media	SD	Intervalo
0	0.20	0.20	0.00-0.62
3	1.41	0.40	0.66-1.98
7	1.04	0.48	0.15-1.86
15	1.65	0.63	0.48-2.84
30	2.08	0.94	1.03-4.17
45	2.45	0.91	1.19-4.66
60	3.24	0.85	2.15-5.03
75	3.47	0.74	2.02-5.03
90	2.92	0.47	2.02-3.73
105	2.67	0.51	1.59-3.42
120	2.48	0.51	1.24-3.16
135	2.28	0.45	1.29-2.96
150	2.07	0.54	1.09-2.98

* Valores medios sobre 10 cabras, con dos determinaciones por muestra.

En las Figuras 5 y 6 se representa la evolución de la actividad lactoperoxidasa durante la lactación.

Los niveles de lactoperoxidasa en la leche de cabra alcanzaron una media de 0.95 U/ml en la raza Verata y de 2.15 U/ml en la raza Murciano-Granadina. La media total de las dos razas dió un valor de 1.55 U/ml, igual al obtenido para el rebaño cruzado de razas múltiples.

Como se ha indicado en el apartado anterior, el contenido de lactoperoxidasa de la leche de cabra es superior al descrito en leches de vaca, búfala y oveja. Los valores individuales máximos de lactoperoxidasa en la leche de cabra fueron de 2.80 U/ml para la raza Verata y de 5.03 U/ml para la raza Murciano-Granadina, superiores a los obtenidos en leche de oveja que se situaron entre 0.14 y 2.38 U/ml (Medina et al., 1989). El máximo contenido de lactoperoxidasa se ha detectado en conejillos de indias con un valor de 22 U/ml (Stephens et al., 1979).

Mediante análisis de varianza se encontraron efectos significativos de la raza ($P < 0.001$), del individuo ($P < 0.001$) y del tiempo de lactación ($P < 0.001$) sobre los niveles de lactoperoxidasa (Tabla 13).

Los valores más bajos de lactoperoxidasa en la leche de cabra de las razas Verata y Murciano-Granadina se dieron en las primeras 24 h después del parto: 0.03 U/ml para la raza Verata y 0.20 U/ml para la raza Murciano-Granadina. Estos valores eran significativamente diferentes de los obtenidos en cualquier otro tiempo de lactación.

Los niveles de lactoperoxidasa en la leche de cabra evolucionan durante la lactación de manera distinta a como lo hacen los de la leche de vaca (Reiter, 1985). Las concentraciones más bajas se obtuvieron durante las primeras 24 h después del parto en ambas razas. En la raza Verata, la lactoperoxidasa aumentó desde 0.03 U/ml en las primeras 24 h hasta 0.59-1.00 U/ml en los tres primeros meses de la lactación, con la excepción del valor de 1.23 U/ml a los 7 d. Los niveles más altos de lactoperoxidasa se detectaron al final del período de lactación. En la raza Murciano-Granadina, la actividad lactoperoxidasa creció desde 0.20 U/ml en las primeras 24 h hasta 3.24 U/ml (60 d) y 3.47 U/ml (75 d) en el período medio de la lactación, decreciendo posteriormente hasta 2.07 U/ml a los 150 d.

Figura 5. Evolución de la actividad lactoperoxidasa en leche de cabra Verata durante la lactación.

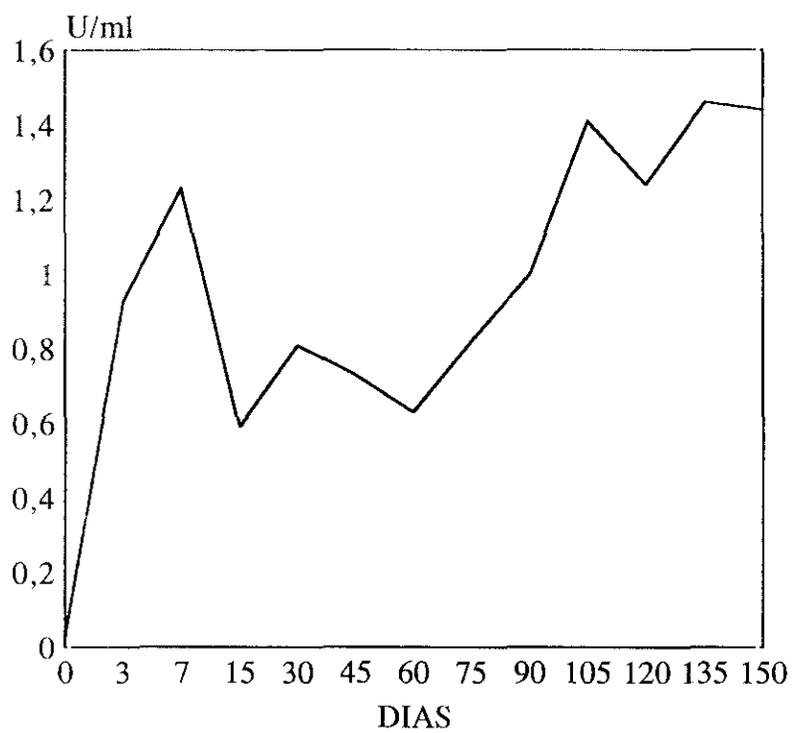


Figura 6. Evolución de la actividad lactoperoxidasa en leche de cabra Murciano-Granadina durante la lactación.

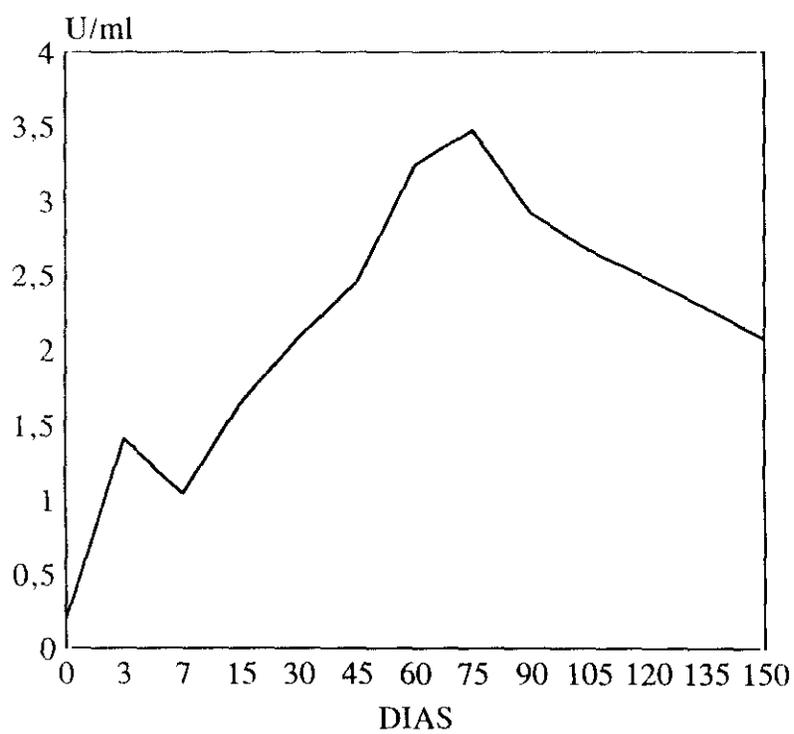


Tabla 13. Niveles de significación de los efectos raza, individuo y tiempo de lactación sobre los componentes del sistema lactoperoxidasa.

Componentes del sistema	Raza	Individuo	Tiempo de lactación
Lactoperoxidasa	***	***	***
Tiocianato	***	***	***

*** $P < 0.001$

En cuanto a las diferencias detectadas entre individuos, los niveles máximos de lactoperoxidasa en la raza Murciano-Granadina correspondieron al mismo individuo en todos los tiempos de lactación salvo en dos, mientras que en la raza Verata cuatro individuos compartieron la mayor actividad lactoperoxidasa durante los cinco meses de lactación. Un individuo de la raza Murciano-Granadina dió a los 60 y a los 75 días la máxima actividad lactoperoxidasa (5.03 U/ml).

3.2.2.2. Tiocianato

Los niveles de tiocianato en leche de cabra de las razas Verata y Murciano-Granadina durante la lactación se recogen en las Tablas 14 y 15, respectivamente.

El contenido medio de tiocianato en la leche de cabra de la raza Verata fue de 5.76 ppm (Tabla 14), mientras que el de la raza Murciano-Granadina fue de 3.20 ppm (Tabla 15). La media total de las dos razas dió un valor de 4.5 ppm. El máximo nivel de tiocianato detectado correspondió a una muestra individual de raza Verata a los 90 días y fue de 15.85 ppm.

El contenido de tiocianato en la leche de vaca se sitúa en los intervalos 1-10 ppm (Wood, 1975), 3.2-4.6 ppm (Björck et al., 1979) y 1.6-7.0 ppm (Härnulf & Kandasamy, 1982). En la leche de búfala se dan valores de 5.4 ppm (Härnulf & Kandasamy, 1982), 2.6 ppm (Chakraborty et al., 1986) y 5.5-6.0 ppm (Thakar & Dave, 1986). Finalmente, en la leche de oveja se han encontrado altas concentraciones de tiocianato, con una media de 10.3 ppm (Medina et al., 1989).

Los contenidos de tiocianato relativamente bajos en la leche de cabra pueden deberse al tipo de alimentación. Las cabras de ambas razas fueron alimentadas fundamentalmente con pastos naturales y su dieta no fue controlada. Por esta razón es difícil separar el efecto raza del efecto derivado de la alimentación en los niveles de tiocianato.

El análisis de varianza detectó el efecto significativo de la raza ($P < 0.001$), individuo ($P < 0.001$) y tiempo de lactación ($P < 0.001$) (Tabla 13). Como se ha indicado, el efecto raza puede deberse en parte a la influencia de la distinta alimentación en los dos rebaños.

Tabla 14. Niveles* de tiocianato (ppm) en leche de cabra Verata durante la lactación.

Días tras el parto	Tiocianato		
	Media	SD	Intervalo
0	5.06	2.48	2.38-11.17
3	3.49	0.90	2.36- 4.93
7	3.74	1.63	2.31- 7.81
15	5.89	2.95	2.86-10.93
30	5.57	2.02	3.05- 9.20
45	5.24	2.67	2.40-11.53
60	7.94	2.03	4.96-11.42
75	4.84	1.51	2.37- 7.70
90	8.46	3.52	3.57-15.85
105	5.67	2.23	1.46-10.00
120	5.08	2.12	2.44- 8.35
135	5.98	2.69	2.51-12.61
150	7.91	2.12	3.55-12.12

* Valores medios sobre 10 cabras, con dos determinaciones por muestra.

Tabla 15. Niveles* de tiocianato en leche de cabra Murciano-Granadina durante la lactación.

Días tras el parto	Tiocianato		
	Media	SD	Intervalo
0	2.53	0.55	1.58-3.52
3	2.41	0.72	1.57-4.27
7	1.62	0.70	0.76-3.41
15	3.58	1.12	2.40-6.50
30	3.09	0.72	2.08-4.16
45	2.98	0.76	1.81-4.17
60	2.79	0.67	1.96-4.47
75	3.34	0.75	2.30-4.70
90	2.89	1.07	1.61-5.37
105	4.07	0.64	3.13-5.21
120	4.23	0.86	2.91-5.57
135	4.01	0.63	2.93-4.88
150	4.08	0.99	2.90-6.52

* Valores medios sobre 10 cabras, con dos determinaciones por muestra.

En la raza Verata se detectaron niveles medios de tiocianato de alrededor de 8 ppm en los días 60, 90 y 150 del período de lactación, mientras que el resto de los días presentó valores de 5-6 ppm, con la excepción de los días 3 y 7 en que se encontraron los valores mínimos de 4 ppm. En la raza Murciano-Granadina las concentraciones medias de tiocianato se situaron entre 2.5 y 3.5 ppm hasta los 90 días del periodo de lactación, a partir de los cuales aumentaron hasta un máximo de 4 ppm.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio sobre los componentes del sistema lactoperoxidasa en leche de cabra, la activación del sistema puede ser una forma de conservar la leche cruda a temperatura ambiente y de mejorar su calidad bacteriológica a temperaturas de refrigeración, mediante la adición de niveles bajos de tiocianato y de peróxido de hidrógeno (~ 0.3 mM). La concentración de lactoperoxidasa presente de forma natural en la leche de cabra no sería un factor limitante, ya que la actividad lactoperoxidasa en leche de cabra es incluso superior a la encontrada en leche de otras especies.

Ya que la producción de leche de cabra en nuestro país se ha incrementado durante los últimos años, y dado que la refrigeración no puede aplicarse en diversas zonas, la activación del sistema lactoperoxidasa supondría el empleo de un método antibacteriano natural que podría mejorar considerablemente la calidad microbiológica de la leche de cabra.

3.3. ACTIVACIÓN DEL SISTEMA LACTOPEROXIDASA EN LA LECHE CRUDA DE CABRA. EFECTO SOBRE LOS MICROORGANISMOS TOTALES Y PSICROTROFOS GRAM NEGATIVOS DURANTE LA CONSERVACIÓN DE LA LECHE A TEMPERATURAS DE REFRIGERACIÓN Y A TEMPERATURA AMBIENTE

3.3.1. Comportamiento de los microorganismos totales y psicrotrofos Gram negativos (G-) a temperaturas de refrigeración (4°C y 8°C)

3.3.1.1. Microorganismos totales

La evolución de los niveles de microorganismos totales en la leche cruda de cabra control y con el sistema lactoperoxidasa activado a lo largo de 7 días de conservación a 4°C y a 8°C se muestra en las Tablas 16 y 17, respectivamente. El número de microorganismos totales a las 0 h fue de 6.14 log ufc/ml. Tras efectuar el análisis de varianza, se han detectado efectos altamente significativos ($P < 0.001$) de la activación del sistema lactoperoxidasa, así como de la temperatura y tiempo de incubación sobre los microorganismos totales a 4°C y 8°C (Tabla 18).

La actividad lactoperoxidasa y el contenido en tiocianato medios de la leche antes de activar el sistema lactoperoxidasa fueron de 1.18 U/ml y 2.98 ppm, respectivamente, ligeramente inferiores a los valores medios indicados en el capítulo anterior.

A 4°C (Tabla 16), tanto en la leche control como en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado, el número de microorganismos totales se mantuvo estable durante las primeras 8 h, tras las cuales se inició el crecimiento. La regresión lineal entre el tiempo y el logaritmo de los totales (0h-3d; $r^2=0.988$) permitió establecer que en la leche control a 4°C eran necesarias 55.6 h para que el logaritmo de totales aumentase 1 unidad.

En leche con el sistema lactoperoxidasa activado el crecimiento de los totales fue más lento que en la leche control. De acuerdo con la regresión lineal (0h-5d; $r^2=0.957$) entre el tiempo y el logaritmo de totales en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado a 4°C se precisaban 95.2 h para que el logaritmo de totales se incrementara en 1 unidad. A partir de las 32 h se detectaron diferencias

Tabla 16. Niveles* de microorganismos totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 4°C.

Incubación	C	A
8 h	6.15	6.13
24 h	6.54	6.48
32 h	6.63	6.40 ^a
2 d	7.00	6.60 ^a
3 d	7.36	6.77 ^a
4 d	7.84	6.99 ^a
5 d	8.27	7.50 ^a
6 d	8.62	7.79 ^a
7 d	8.69	8.46 ^a

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente inferior ($P < 0.01$) al correspondiente en leche control.

Tabla 17. Niveles* de microorganismos totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 8°C.

Incubación	C	A
8 h	6.19	6.08 ^a
24 h	6.71	6.47 ^a
32 h	6.91	6.79 ^a
2 d	7.59	7.01 ^a
3 d	8.04	6.95 ^a
4 d	8.42	7.79 ^a
5 d	8.78	8.62 ^a
6 d	8.84	8.61 ^a
7 d	8.98	8.82 ^a

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente inferior ($P < 0.01$) al correspondiente en leche control.

Tabla 18. Niveles de significación de los factores principales sobre los grupos microbianos estudiados a 4°C y 8°C.

Factor	Totales	Psicrotrofos G-
Activación LP	***	***
Tiempo	***	***
Temperatura	***	***

***, $P < 0.001$

significativas ($P < 0.01$) entre los valores de la leche control y los de la leche tratada, con niveles inferiores en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado. Las máximas diferencias, próximas a 0.8 log ufc/ml, corresponden a los 4-6 d de incubación a 4°C. Al final de la incubación, la leche con el sistema lactoperoxidasa activado alcanzó 8.46 log ufc/ml, frente a 8.69 log ufc/ml en la leche control.

A 8°C (Tabla 17), la leche control presenta igualmente una pequeña fase de latencia hasta las 8 h, momento a partir del cual se inicia el crecimiento. Según la regresión lineal (0h-2d; $r^2=0.972$), en leche control a 8°C eran necesarias 32.6 h para que el logaritmo de totales se incrementase en 1 unidad. En la leche con el sistema lactoperoxidasa activado la duración de la fase de latencia es la misma que en la leche control. De acuerdo con la regresión lineal (0h-4d; $r^2=0.909$), en leche con el sistema lactoperoxidasa activado a 8°C se precisaban 61.4 h para que el logaritmo de totales aumentase 1 unidad. Sin embargo, el crecimiento es menor y a partir de las 8 h los niveles en la leche tratada son significativamente menores que los de la leche control. La máxima diferencia, de 1.09 unidades logarítmicas, se encontró a los 3 d de incubación. A los 7 d esta diferencia se había reducido, con niveles de 8.98 log ufc/ml en la leche control y 8.82 log ufc/ml en la leche tratada.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que el sistema lactoperoxidasa inhibe parcialmente el crecimiento de los microorganismos totales a temperaturas de refrigeración en la leche cruda de cabra. El efecto no es bactericida ni se detecta una extensión de la fase de latencia, pero sí se produce un menor crecimiento en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado. A 8°C el efecto inhibitorio máximo ocurre antes que a 4°C.

Los valores de pH de la leche resultaron influenciados significativamente ($P < 0.001$) por la activación del sistema lactoperoxidasa, la temperatura y el tiempo de incubación. A partir de los 4 d, la diferencia entre leche con el sistema lactoperoxidasa activado y leche control es de 0.30 unidades. A los 7 d a 4°C, los valores de pH fueron de 5.80 en leche con el sistema lactoperoxidasa activado y 5.04 en leche control. A 8°C, la mayor diferencia se detectó a los 3-4 días, con valores de pH en leche con el sistema lactoperoxidasa activado 0.75 unidades superiores a los comprobados en leche control. El pH a los 7 d en leche con el sistema lactoperoxidasa activado fue de 4.83, mientras que en leche control fue de 4.74.

3.3.1.2. Psicrotrofos Gram negativos

Las Tablas 19 y 20 muestran los niveles de psicrotrofos G- durante 7 d de incubación a 4°C y a 8°C, respectivamente, de la leche cruda de cabra control y con el sistema lactoperoxidasa activado. Los niveles de psicrotrofos en leche a las 0 h fueron de 4.75 log ufc/ml. Se han detectado efectos altamente significativos ($P < 0.001$) de la activación del sistema lactoperoxidasa, y de la temperatura y tiempo de incubación sobre los niveles de estos microorganismos (Tabla 18).

En la leche control a 4°C (Tabla 19) se inició el crecimiento desde los primeros momentos de la incubación. Según la regresión lineal (0h-2d; $r^2 = 0.999$) hacían falta 33.7 h para que el logaritmo de psicrotrofos G- aumentase 1 unidad. En la leche con el sistema lactoperoxidasa activado también se inició el crecimiento desde las primeras horas de la incubación pero éste fue más lento. De acuerdo con la regresión lineal (0h-5d; $r^2 = 0.939$) eran necesarias 91.9 h para que el logaritmo de psicrotrofos G- se incrementase en 1 unidad.

Cuando se comparan los niveles de psicrotrofos G- en la leche control y en la tratada se detectan diferencias significativas a partir de las 8 h de incubación. Desde los 2 d hasta los 7 d los niveles de psicrotrofos G- son por lo menos 1 unidad logarítmica menores en la leche tratada que en la leche control, siendo máximas las diferencias a los 3 d (1.56 log ufc/ml). A los 7 d los niveles eran de 7.67 log ufc/ml en la leche control y 6.68 log ufc/ml en la leche tratada.

La pauta de crecimiento en la leche control a 8°C (Tabla 20) es similar a la de 4°C, aunque con un aumento más rápido de la población de psicrotrofos G-. Según la regresión lineal (0h-24h; $r^2 = 0.979$) hacían falta 20.8 h para que el logaritmo de psicrotrofos G- aumentase 1 unidad. Cuando se activa el sistema lactoperoxidasa a 8°C el crecimiento comienza desde las primeras horas de la incubación, pero es menor que en la leche control. De acuerdo con la regresión lineal (0h-3d; $r^2 = 0.910$) se requerían 61.3 h para que el logaritmo de psicrotrofos G- se incrementase en 1 unidad. A partir de las 24 h se detectaron diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los niveles de psicrotrofos G- de la leche control y tratada. La diferencia máxima tiene lugar a los 4 d (1.40 log ufc/ml). A los 7 d los psicrotrofos G- alcanzaron 7.94 log ufc/ml en la leche control frente a únicamente 6.70 log ufc/ml en la leche tratada.

Tabla 19. Niveles* de microorganismos psicrotrofos Gram negativos (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 4°C.

Incubación	C	A
8 h	4.94	4.85 ^a
24 h	5.43	5.05 ^a
32 h	5.67	5.02 ^a
2 d	6.16	5.15 ^a
3 d	6.85	5.29 ^a
4 d	7.00	5.69 ^a
5 d	7.17	6.20 ^a
6 d	7.64	6.57 ^a
7 d	7.67	6.68 ^a

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente ($P < 0.01$) inferior al correspondiente en leche control.

Tabla 20. Niveles* de microorganismos psicrotrofos Gram negativos (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 8°C.

Incubación	C	A
8 h	4.97	4.94
24 h	5.87	5.08 ^a
32 h	6.29	5.21 ^a
2 d	6.49	5.27 ^a
3 d	7.38	6.06 ^a
4 d	7.57	6.14 ^a
5 d	7.67	6.42 ^a
6 d	7.87	6.86 ^a
7 d	7.94	6.70 ^a

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente ($P < 0.01$) inferior al correspondiente en leche control.

El sistema lactoperoxidasa se mostró efectivo en la inhibición de los microorganismos psicrotrofos G- a temperaturas de refrigeración en la leche cruda de cabra. No se detectó ningún efecto bactericida, al igual que para los microorganismos totales, ni tuvo lugar una fase de latencia en la leche control ni en la tratada, al contrario de lo que se observó para los microorganismos totales. La inhibición consistió en un crecimiento más lento de las bacterias psicrotrofas G- en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado. En la presente experiencia se comprobó que el sistema lactoperoxidasa es más efectivo contra los microorganismos psicrotrofos G- que contra los totales.

Björck (1978) encontró un efecto bactericida del sistema lactoperoxidasa sobre los psicrotrofos en leche cruda de vaca conservada a 5°C. Los niveles se redujeron de 5.8 a 5.0 log ufc/ml a los 2 d y se mantuvieron constantes durante los primeros 5 d. Por su parte, la población bacteriana de la leche control no creció en las primeras 48 h. En un trabajo posterior realizado en Kenia, Björck et al. (1979) conservaron la leche a 15°C durante 30 h sin crecimiento de microorganismos totales, partiendo de una población inicial de 2.5×10^5 ufc/ml y detectando un ligero descenso de ésta en las primeras 12 h.

Mediante sucesivas activaciones del sistema lactoperoxidasa, Zajac et al. (1983b) mantuvieron estables los niveles de microorganismos totales y psicrotrofos durante 104 h en leche de vaca conservada a 4°C. Esto ocurrió tanto en la leche de alta calidad microbiológica (5.5×10^4 totales/ml y 8.0×10^3 psicrotrofos/ml) como en la de baja calidad microbiológica (3.4×10^5 totales/ml y 8.5×10^4 psicrotrofos/ml). Los resultados mostraron un crecimiento de ambos grupos microbianos a lo largo de la incubación, interrumpido por una reducción del número de bacterias después de cada activación del sistema lactoperoxidasa (a las 48 y 96 h). En otro trabajo, Zajac et al. (1983a) activaron el sistema lactoperoxidasa a las 0, 24 y 48 h y encontraron parecidos resultados a 4°C. A 10°C, partiendo de 5.9 log totales/ml, obtuvieron una reducción a las 24 h de aproximadamente 0.5 unidades logarítmicas y mantuvieron estos niveles durante 72 h. El comportamiento de los psicrotrofos fue similar al de los microorganismos totales.

Incluso a 14°C y partiendo de una leche de muy baja calidad microbiológica (próxima a 7 log ufc/ml), Kamau & Kroger (1984) encontraron un descenso en el número de microorganismos totales hasta 6 log ufc/ml a las 2 h, manteniéndose

estable su número hasta las 6 h, tras las cuales se inició el crecimiento, para sobrepasar la cifra inicial a las 16 h de incubación.

3.3.2. Comportamiento de los microorganismos totales y psicrotrofos Gram negativos a temperatura ambiente (20°C)

3.3.2.1. Microorganismos totales

En la Tabla 21 se muestran los niveles de los microorganismos totales en la leche cruda de cabra durante su conservación a 20°C a lo largo de 2 días. La activación del sistema lactoperoxidasa no influyó significativamente sobre los niveles de microorganismos totales en la leche de cabra mantenida a 20°C (Tabla 22), cuyos niveles aumentaron tanto en la leche tratada como en la leche control desde el inicio de la incubación. En la leche control se requerían 12.8 h para que aumentase 1 unidad el logaritmo de totales según la regresión lineal (0h-24h; $r^2=0.966$). En la leche tratada eran necesarias 13.1 h, según la correspondiente regresión lineal (0h-24h; $r^2=0.979$).

Tampoco el pH de la leche resultó influido por la activación del sistema lactoperoxidasa. A las 8 h se registraron valores de 6.42 en leche con el sistema lactoperoxidasa activado y 6.23 en leche control, y a las 24 h el pH fue de 4.52 y 4.42, respectivamente. A los 2 d dichos valores fueron de 4.23 y 4.22.

3.3.2.2. Psicrotrofos Gram negativos

En la Tabla 23 se muestra el crecimiento de los microorganismos psicrotrofos G- durante la conservación por 2 días de la leche cruda de cabra a 20°C. Se detectan efectos altamente significativos ($P<0.001$) de la activación del sistema lactoperoxidasa y del tiempo de incubación sobre los niveles de este grupo microbiano (Tabla 22).

Los psicrotrofos G- crecieron en la leche control hasta un valor máximo de 6.63 log ufc/ml a las 32 h. Según la regresión lineal (0h-24h; $r^2=0.947$) se requerían 17.9 h para que el logaritmo de psicrotrofos G- aumentase 1 unidad. A partir de las 32 h la población de psicrotrofos G- disminuyó, al ser estos microorganismos sensibles a niveles bajos del pH (4.42 a las 24 h). En la leche con el sistema lactoperoxidasa activado los psicrotrofos G- también alcanzaron a las 32

Tabla 21. Niveles* de microorganismos totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 20°C.

Incubación	C	A
8 h	7.10	7.01
24 h	8.08	8.03
32 h	8.60	8.62
2 d	9.16	9.10

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

Tabla 22. Niveles de significación de los factores principales sobre los grupos microbianos estudiados a 20°C.

Factor	Totales	Psicrotrofos G-
Activación LP	NS	***
Tiempo	***	***

NS, no significativo

***, $P < 0.001$

Tabla 23. Niveles* de microorganismos psicrotrofos Gram negativos (ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 20°C.

Incubación	C	A
8 h	5.50	5.07 ^a
24 h	6.15	5.37 ^a
32 h	6.63	5.40 ^a
2 d	5.92	5.24 ^a

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente ($P < 0.01$) inferior al correspondiente en leche control.

h su nivel máximo, pero éste fue de 5.40 log ufc/ml únicamente. Al igual que en la leche control, a partir de las 32 h descendió el nivel de psicrotrofos G- debido a la acidificación del medio por las bacterias lácticas.

A temperatura ambiente el sistema lactoperoxidasa inhibió parcialmente el crecimiento de los microorganismos psicrotrofos G-, pero no así el de los totales. Sin embargo, no se ha podido detectar un efecto bactericida ni siquiera bacteriostático en los tiempos de incubación estudiados.

Björck et al. (1979) obtuvieron mejores resultados como respuesta a la activación del sistema lactoperoxidasa en leche cruda de vaca: a 20°C se mantuvieron los niveles de microorganismos totales en $3.0-4.0 \times 10^5$ ufc/ml durante 15 h. En cambio, en la leche control los totales eran 2 y 1 unidades logarítmicas superiores a los niveles en la leche tratada a las 18 y 24 h de la incubación, respectivamente. A temperaturas superiores la fase de latencia en la leche tratada se prolongó durante 12 h a 25°C y 6 h a 30°C, siendo la población bacteriana en este último caso tan sólo el doble de la inicial a las 9 h. Zajac et al. (1983a), activando el sistema lactoperoxidasa al inicio y a las 24 h de conservación de leche cruda a 17°C, observaron un crecimiento considerable de los microorganismos totales y psicrotrofos a las 24 h. A las 48 h, en la leche tratada los niveles sobrepasaron en 2 unidades logarítmicas los valores iniciales de 2.7×10^6 totales/ml y de 1.1×10^6 psicrotrofos/ml, pero se mantuvieron 2 y 3 unidades logarítmicas, respectivamente, por debajo de los correspondientes a la leche control.

Por otra parte, Kamau & Kroger (1984), 2 h después de activar el sistema lactoperoxidasa en leche cruda a 20°C, observaron una reducción de los microorganismos totales desde 10^7 hasta valores por debajo de 10^5 ufc/ml. Pasadas las 2 h comenzó el crecimiento y se alcanzó el valor inicial al cabo de 10 h de incubación. A las 16 h el nivel de totales en la leche tratada era casi 1 log ufc/ml menor que en la leche control. A 30°C, el sistema lactoperoxidasa redujo igualmente el número de microorganismos en aproximadamente 2 unidades logarítmicas, alcanzándose el valor inicial a las 8 h, mientras que a las 16 h se igualaron los niveles de totales en la leche control y tratada. Según estos autores, la calidad microbiológica de la leche de vaca se conserva mediante activación del sistema lactoperoxidasa > 16 h a 14°C, 12-14 h a 20°C y 8-10 h a 30°C.

Otros investigadores han estudiado el efecto del sistema lactoperoxidasa en la conservación a temperaturas más elevadas de la calidad microbiológica de la leche de especies distintas de la vaca. Härnolv & Kandasamy (1982) encontraron un comportamiento similar en leche de vaca y de búfala frente a una activación del sistema lactoperoxidasa con concentraciones normales de tiocianato y peróxido de hidrógeno y observaron una extensión de la fase de latencia de unas 6 horas a temperaturas por encima de los 30°C. Por el contrario, Gupta et al. (1986) determinaron que la mínima dosis de tiocianato:peróxido de hidrógeno para conservar la calidad microbiológica de la leche cruda a 30°C durante 8 h era de 10:10 ppm en leche de vaca y de 25:10 ppm en leche de búfala. Chakraborty et al. (1986) consiguieron una reducción de totales de 1 unidad logarítmica a las 11 h de incubación, en leche cruda de búfala a 37°C, con una población inicial de 5 log totales/ml añadiendo 75 ppm de NaSCN y 50 ppm de H₂O₂ a las 3 h y una segunda dosis de H₂O₂ de 35 ppm a las 10 h. Sin embargo, la dosis más utilizada de 15:10 ppm sólo incrementó la vida media de la leche en 3 h. Thakar & Dave (1986), en leche de búfala con niveles superiores a 6.5 log ufc/ml, no encontraron reducción alguna de los microorganismos totales a 23, 30 y 37°C con 10 ppm de NaSCN y 10 ppm de H₂O₂, tan sólo un menor crecimiento que en la leche control. En cambio, las concentraciones de 20:20 y 30:30 redujeron la población transcurridas 8, 6 y 4 h a 23, 30 y 37°C respectivamente, comenzando luego el crecimiento con una velocidad semejante a la de la leche control. Los niveles de totales alcanzaron el valor inicial después de 12, 8 y 6 h a las temperaturas citadas.

3.4. ACTIVACIÓN DEL SISTEMA LACTOPEROXIDASA EN LECHE CRUDA DE CABRA INOCULADA CON ALGUNOS MICROORGANISMOS CAUSANTES DE ALTERACIONES (*PSEUDOMONAS FLUORESCENS*) E INDICADORES (*ESCHERICHIA COLI*)

3.4.1. Efecto de la activación del sistema lactoperoxidasa en leche cruda de cabra sobre los niveles de *Ps. fluorescens* durante la conservación de la leche a temperaturas de refrigeración y a temperatura ambiente

3.4.1.1. Comportamiento de *Ps. fluorescens* a temperaturas de refrigeración

La leche empleada en estos experimentos tenía un nivel medio de totales de 2.0×10^4 ufc/ml y un nivel de psicrotrofos G- inferior a 10^2 ufc/ml.

La actividad lactoperoxidasa y el contenido de tiocianato de la leche, antes de activar el sistema lactoperoxidasa, fueron de 2.54 U/ml y 5.16 ppm, respectivamente. Como se indicó en Material y Métodos, la leche fue inoculada con una mezcla de tres cepas de *Ps. fluorescens* previamente aisladas de leche de cabra, a un nivel de aproximadamente 10^4 ufc/ml. Los niveles de *Ps. fluorescens* durante la incubación que se indican seguidamente han sido corregidos para un nivel de inóculo de 4 log ufc/ml.

En la Tabla 24 se muestra la evolución de la población de *Ps. fluorescens* a lo largo de 7 días a 4°C. En la leche control a 4°C se observó un crecimiento continuado y sin fase de latencia, con un incremento superior a las 4 unidades logarítmicas a partir de los 6 d. Según la regresión lineal (0h-2d; $r^2=0.959$) a 4°C se requerían 28.1 h para que el nivel de *Ps. fluorescens* aumentase 1 unidad logarítmica. Al activar el sistema lactoperoxidasa, la población de *Ps. fluorescens* se redujo en más de 1.5 log ufc/ml el primer día y alcanzó el valor mínimo de 2.23 log ufc/ml a los 2 d. Se mantuvo estable hasta los 5 d, momento en que inició el crecimiento para sobrepasar a los 6 d el valor inicial. La mayor diferencia entre los niveles de la leche control y tratada fue de 5.18 unidades logarítmicas, a los 5 d. Según la regresión lineal (5d-7d; $r^2=0.935$), a 4°C en la leche tratada se requerían 161.8 h para que el número de *Ps. fluorescens* aumentase 1 unidad logarítmica.

En la Tabla 25 se indican los niveles de *Ps. fluorescens* durante la

Tabla 24. Niveles* de *Ps. fluorescens* y totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 4°C.

Incubación	<i>Ps. fluorescens</i>		Totales	
	C	A	C	A
1 d	4.55	2.31 ^a	4.75	2.93 ^a
2 d	5.71	2.23 ^a	5.91	2.74 ^a
3 d	6.63	2.58 ^a	6.95	3.11 ^a
4 d	7.14	2.56 ^a	7.37	3.78 ^a
5 d	7.71	2.53 ^a	7.96	3.67 ^a
6 d	8.13	4.43 ^a	8.24	4.51 ^a
7 d	8.15	5.14 ^a	8.30	5.26 ^a

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente inferior ($P < 0.01$) al correspondiente en leche control.

Tabla 25. Niveles* de *Ps. fluorescens* y totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 8°C.

Incubación	<i>Ps. fluorescens</i>		Totales	
	C	A	C	A
1 d	4.95	2.15 ^a	5.00	2.70 ^a
2 d	6.53	2.35 ^a	6.60	2.86 ^a
3 d	7.63	2.83 ^a	7.87	3.23 ^a
4 d	7.99	4.26 ^a	8.11	4.45 ^a
5 d	8.15	5.85 ^a	8.29	5.92 ^a
6 d	8.49	6.81 ^a	8.69	7.03 ^a
7 d	8.58	7.15 ^a	8.67	7.40 ^a

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente inferior ($P < 0.01$) al correspondiente en leche control.

conservación de la leche cruda de cabra a 8°C. El comportamiento de *Ps. fluorescens* en la leche control a 8°C es semejante al observado a 4°C, con un incremento superior a las 4 unidades logarítmicas al cabo de 5 días de incubación. Según las regresiones lineales, *Ps. fluorescens* aumentaba 1 unidad logarítmica a 8°C en la leche control después de 19.0 h (0h-2d; $r^2=0.980$) y en la leche tratada después de 111.0 h (1d-5d; $r^2=0.894$). En la leche con el sistema lactoperoxidasa activado se obtuvo una reducción de la población de *Ps. fluorescens* de casi 2 unidades logarítmicas el primer día de incubación, seguida de un ligero crecimiento de la población hasta los 3 d. A partir de este momento la velocidad de crecimiento aumenta y a los 4 d la población de *Ps. fluorescens* sobrepasa el nivel inicial. La diferencia máxima entre los niveles de *Ps. fluorescens* de la leche control y con el sistema lactoperoxidasa activado se observó a los 3 d y era de 4.80 unidades logarítmicas. Todavía a los 7 d los niveles de *Ps. fluorescens* en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado eran aproximadamente 1.5 unidades logarítmicas menores que en la leche control.

Se han detectado, mediante análisis de varianza, efectos altamente significativos ($P<0.001$) de la activación del sistema lactoperoxidasa, de la temperatura y del tiempo de incubación sobre los niveles de *Ps. fluorescens* (Tabla 26). El sistema lactoperoxidasa se mostró bactericida para *Ps. fluorescens* a 4°C y a 8°C. Los niveles de *Ps. fluorescens* se mantuvieron por debajo del nivel inicial durante 5 d a 4°C y 3 d a 8°C. Aunque las diferencias en los niveles de *Ps. fluorescens* entre la leche control y la tratada fueron del mismo orden a ambas temperaturas, las diferencias máximas se dieron 2 días antes a 8°C que a 4°C.

Los niveles de microorganismos totales en leche a las 0 h eran de 4.30 log ufc/ml. El comportamiento de los microorganismos totales a las temperaturas de refrigeración, tanto en la leche control como en la tratada, fue paralelo al de *Ps. fluorescens*, ya que esta especie era la población dominante. En ningún caso se detectó una fase de latencia en el crecimiento de los microorganismos estudiados en la leche control. El tiempo necesario para que los totales aumentasen 1 unidad logarítmica a 4°C fue de 40.2 h en la leche control y de 192.8 h en la leche tratada, mientras que a 8°C estos tiempos fueron de 27.6 h y de 122.7 h, respectivamente.

El pH resultó influido significativamente ($P<0.01$) por la activación del sistema lactoperoxidasa. En la leche tratada los valores de pH se mantuvieron entre 6.97 y 6.76 a 4°C y entre 6.98 y 6.66 a 8°C durante los 7 días de incubación.

Tabla 26. Niveles de significación de los factores principales sobre los grupos microbianos estudiados a 4°C y 8°C.

Factor	<i>Ps. fluorescens</i>	Totales
Activación LP	***	***
Tiempo	***	***
Temperatura	***	***

***, $P < 0.001$

3.4.1.2. Comportamiento de *Ps. fluorescens* a temperatura ambiente

La evolución de los niveles de *Ps. fluorescens* en la leche cruda de cabra conservada a 20°C se muestra en la Tabla 27. Se detectaron efectos altamente significativos ($P < 0.001$) de la activación del sistema lactoperoxidasa y del tiempo de incubación sobre *Ps. fluorescens*, tras la realización del análisis de varianza (Tabla 28).

El crecimiento de *Ps. fluorescens* en la leche control tuvo lugar desde el principio de la incubación, alcanzándose el valor máximo a los 2 d (7.74 log ufc/ml). Entre los 2 d y los 3 d, sin embargo, se produjo un descenso en el número de *Ps. fluorescens* debido posiblemente a la acidificación de la leche por las bacterias lácticas, que a los 2 d habían alcanzado 9.25 log ufc/ml. En leche con el sistema lactoperoxidasa activado los niveles de *Ps. fluorescens* descendieron casi 1 unidad logarítmica en las primeras 8 h de incubación. A partir de las 8 h comenzó el crecimiento, hasta llegar a 10^7 ufc/ml a los 2 d. Según la regresión lineal, en la leche control (0h-1d; $r^2=0.946$) se requerían 9.1 h para un incremento de 1 unidad logarítmica y en la leche tratada (8h-2d; $r^2=1.000$) eran necesarias 27.4 h. La diferencia máxima entre los niveles de *Ps. fluorescens* de la leche control y tratada fue de 1.82 unidades logarítmicas a las 24 h. A los 3 d la leche con el sistema lactoperoxidasa activado contenía más *Ps. fluorescens* que la leche control, a causa de la mayor inhibición de *Ps. fluorescens* por bacterias lácticas que tenía lugar en la segunda.

En cuanto a los microorganismos totales, en la leche control alcanzaron 6.81 unidades logarítmicas a las 24 h y 9.25 a los 2 d (Tabla 27). Al activar el sistema lactoperoxidasa se consiguió una reducción del número de totales a las 8 h, pero se inició seguidamente el crecimiento hasta alcanzar 5.43 log ufc/ml a las 24 h. De acuerdo con las correspondientes regresiones lineales, eran necesarias 15.9 h en la leche control y 21.4 h en la leche tratada para que los totales aumentasen 1 unidad logarítmica a 20°C. Los microorganismos totales tienen pues un comportamiento similar al de *Ps. fluorescens* pero con un mayor crecimiento a partir de las 8 h, que refleja el hecho de que las bacterias lácticas pasan a ser la población dominante en detrimento de las pseudomonas.

Se comprobó la existencia de diferencias significativas entre el pH de la leche con el sistema lactoperoxidasa activado y la leche control. Esta diferencia se hizo

Tabla 27. Niveles' de *Ps. fluorescens* y totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 20°C.

Incubación	<i>Ps. fluorescens</i>		Totales	
	C	A	C	A
8 h	4.27	3.15 ^a	4.40	3.30 ^a
1 d	6.51	4.69 ^a	6.81	5.43 ^a
2 d	7.74	6.95 ^a	9.25	8.17 ^a
3 d	5.87	6.85	8.98	9.30

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente inferior ($P < 0.01$) al correspondiente en leche control.

Tabla 28. Niveles de significación de los factores principales sobre los grupos microbianos estudiados a 20°C.

Factor	<i>Ps. fluorescens</i>	Totales
Activación LP	***	***
Tiempo	***	***

***, $P < 0.001$

patente al cabo de 2 d de incubación, con un valor de pH de 6.41 en leche con el sistema lactoperoxidasa activado y 4.86 en leche control. A los 3 d el pH fue de 4.49 y 4.39, respectivamente.

El sistema lactoperoxidasa resultó bactericida para *Ps. fluorescens* en la leche cruda de cabra a 20°C. Este efecto se detectó a las 8 h, aunque posiblemente tenga su máxima expresión antes. Se deduce de nuestros resultados una relación entre la temperatura de incubación y el tiempo en el cual se obtiene el máximo efecto bactericida, y entre la temperatura de incubación y la duración de tal efecto.

Björck et al. (1975) utilizaron un sistema enzimático de producción de peróxido de hidrógeno para activar el sistema lactoperoxidasa frente a *Ps. fluorescens*. El sistema lactoperoxidasa resultó bactericida frente a *Ps. fluorescens* EF 1998 en leche cruda de vaca inoculada con este microorganismo e incubada a 30°C. La población inicial de pseudomonas pasó de más de 6 a menos de 3 unidades logarítmicas a las 4 h de incubación, manteniéndose estable hasta las 10 h para luego crecer con una velocidad semejante a la de la leche control. A las 24 h de incubación todavía se encontraba muy por debajo del nivel inicial. Estos autores encontraron que a 30°C el efecto bactericida frente a *Ps. fluorescens* del suero tratado con tiocianato 0.26 mM, glucosa al 0.3% y la enzima glucosa oxidasa inmovilizada desaparecía a las 4 h, explicándose así el que tras ese tiempo las bacterias comenzasen su multiplicación. A 5°C, el efecto duraba hasta 24 h, aunque Hogg & Jago (1970) encontraron que el compuesto bactericida en un medio sintético era estable durante varios días a bajas temperaturas. Al ensayar el sistema lactoperoxidasa sobre otros microorganismos Gram negativos aislados previamente de leche e inoculados en concentraciones de $2-4 \times 10^6$ ufc/ml en el suero, al cual se añadió glucosa/glucosa oxidasa y el resto de los componentes necesarios, se registró la muerte del 91% del inóculo a las 4 h de incubación a 30°C.

En estudios posteriores, Björck (1978) comparó el efecto bactericida a 30°C y a 5°C del sistema lactoperoxidasa frente a una población inicial de 10^6 ufc/ml de *Ps. fluorescens* EF 1998 en un medio semi-sintético, al que añadió 5 µg/ml de lactoperoxidasa y 0.25 mM de tiocianato y de peróxido de hidrógeno. A 30°C, el máximo efecto bactericida se observó a las 4 h, comenzando luego el crecimiento para sobrepasar el nivel inicial a las 25 h. A 5°C, la reducción máxima del nivel inicial se produjo más tarde, pero antes de las 24 h, manteniéndose la población por debajo de 2 log ufc/ml hasta las 72 h.

3.4.2. Efecto de la activación del sistema lactoperoxidasa en leche cruda de cabra sobre los niveles de *E. coli* durante la conservación de la leche a temperaturas de refrigeración y a temperatura ambiente

3.4.2.1. Comportamiento de *E. coli* a temperaturas de refrigeración

La actividad lactoperoxidasa y el contenido de tiocianato de la leche empleada en las dos experiencias, antes de activar el sistema lactoperoxidasa, fue de 2.59 U/ml y 4.92 ppm, respectivamente. El nivel de microorganismos totales antes de inocular la leche era de 4.26 log ufc/ml y el de *E. coli* de 2.87 log ufc/ml.

El comportamiento de *E. coli* durante la incubación de la leche cruda de cabra control y con el sistema lactoperoxidasa activado, a 4°C y a 8°C, se muestra en las Tablas 29 y 30, respectivamente. Los datos han sido corregidos para un inóculo de *E. coli* de 4 log ufc/ml. Mediante análisis de varianza se han detectado efectos altamente significativos ($P < 0.001$) de la activación del sistema lactoperoxidasa, de la temperatura y del tiempo de incubación sobre los niveles tanto de *E. coli* como de los microorganismos totales (Tabla 31).

A 4°C (Tabla 29), no se detectó crecimiento de *E. coli* ni en la leche control ni en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado. En la leche control se produjo un incremento de 0.32 unidades logarítmicas entre las 0 y las 24 h. En la leche con el sistema lactoperoxidasa activado también se produjo un ligero crecimiento de *E. coli* el primer día, estabilizándose luego los niveles durante el resto de la incubación. Las diferencias entre la leche control y la tratada que se detectan a los 5, 6 y 7 d de incubación, aunque significativas, no tienen importancia práctica.

A 8°C (Tabla 30) se produjo el crecimiento de *E. coli* en la leche control desde el principio de la incubación, con un incremento de casi 4 unidades logarítmicas durante los 7 d de incubación. En la leche con el sistema lactoperoxidasa activado también tuvo lugar el crecimiento de *E. coli* desde el inicio de la incubación, aunque éste fue menor que en el caso de la leche control. Según las respectivas regresiones lineales, para un incremento de 1 unidad logarítmica en el número de *E. coli* se requerían 42.5 h en la leche control (0h-2d; $r^2 = 0.996$) y 54.8 h en la leche tratada (0h-4d; $r^2 = 0.896$). Desde el primer día hasta el quinto día de conservación se detectaron diferencias significativas en los niveles de *E. coli* entre la leche control y la leche con el sistema lactoperoxidasa activado, que

Tabla 29. Niveles* de *E. coli* y totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 4°C.

Incubación	<i>E. coli</i>		Totales	
	C	A	C	A
1 d	4.32	4.27	4.63	4.73
2 d	4.19	4.28	4.74	4.68
3 d	4.27	4.26	4.68	4.66
4 d	4.34	4.24	4.80	4.61 ^a
5 d	4.33	4.20 ^a	5.24	4.70 ^a
6 d	4.26	4.11 ^a	5.99	4.75 ^a
7 d	4.29	4.13 ^a	6.98	4.99 ^a

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente ($P < 0.01$) inferior al correspondiente a la leche control.

Tabla 30. Niveles* de *E. coli* y totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 8°C.

Incubación	<i>E. coli</i>		Totales	
	C	A	C	A
1 d	4.63	4.26 ^a	5.04	4.74 ^a
2 d	5.13	4.38 ^a	5.50	4.91 ^a
3 d	5.96	4.98 ^a	6.50	5.40 ^a
4 d	6.74	5.83 ^a	7.50	6.27 ^a
5 d	7.31	6.66 ^a	8.25	7.29 ^a
6 d	7.81	7.81	8.70	8.32 ^a
7 d	7.90	8.01	8.64	8.63

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente ($P < 0.01$) inferior al correspondiente a la leche control.

Tabla 31. Niveles de significación de los factores principales sobre los grupos microbianos estudiados a 4 y 8°C.

Factor	<i>E. coli</i>	Totales
Activación LP	***	***
Tiempo	***	***
Temperatura	***	***

***: $P < 0.001$

alcanzaron un máximo de 0.98 unidades logarítmicas a los 3 d. Al final de la incubación, los niveles alcanzados por *E. coli* en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado no diferían de los de la leche control.

Los microorganismos totales sí se multiplicaron a 4°C en la leche control, fundamentalmente a partir de los 4 días de incubación. Según la regresión lineal se requerían 129.0 h para un incremento de 1 unidad logarítmica en el número de totales. A los 7 d, se obtuvieron niveles 2 unidades logarítmicas inferiores en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado (Tabla 29). Esta disminución de los niveles de totales por el sistema lactoperoxidasa a 4°C debe responder a la acción de éste sobre los microorganismos psicrotrofos. El comportamiento de los microorganismos totales a 8°C en la leche control (Tabla 30) sigue la misma pauta que en el caso de *E. coli*, pero con un mayor crecimiento de los primeros. Cuando se activó el sistema lactoperoxidasa el crecimiento de los microorganismos totales fue menor. Según las correspondientes regresiones lineales, se requerían 38.2 h para que los totales aumentasen 1 unidad logarítmica en la leche control, y 58.8 h en la leche tratada. La diferencia en totales entre leche control y leche tratada fue máxima a los 3 d con 1.1 log ufc/ml.

El pH de la leche a las 0 h fue de 6.57. Se comprobó la influencia significativa ($P < 0.001$) de la temperatura y del tiempo de incubación sobre los valores de pH, mientras que la activación del sistema lactoperoxidasa no resultó significativa. A los 7 d de incubación a 4°C, el pH de la leche con el sistema lactoperoxidasa activado fue de 6.75, mientras que en leche control el pH fue de 6.76. Tras 7 d a 8°C dichos valores fueron de 6.28 y 6.23, respectivamente.

El sistema lactoperoxidasa inhibió el crecimiento de *E. coli* a temperaturas de refrigeración sin apreciarse un efecto bactericida ni producirse una fase de latencia. Su efecto a 4°C fue mínimo al no registrarse el crecimiento de *E. coli*, mientras que a 8°C el sistema lactoperoxidasa redujo sensiblemente la velocidad de crecimiento de *E. coli*.

3.4.2.2. Comportamiento de *E. coli* a temperatura ambiente

La evolución de los niveles de *E. coli* y de los microorganismos totales durante la conservación de la leche cruda de cabra a 20°C, activando o no el sistema lactoperoxidasa, se muestra en la Tabla 32. Se han detectado efectos altamente

($P < 0.001$) significativos de la activación del sistema lactoperoxidasa y del tiempo de incubación sobre los niveles de ambos grupos microbianos (Tabla 33).

En la leche control *E. coli* tuvo un crecimiento rápido, siendo únicamente necesarias 5.7 h para un incremento de 1 unidad logarítmica (0h-1d; $r^2 = 0.997$). Al activar el sistema lactoperoxidasa el crecimiento que se produjo es sensiblemente menor durante el primer día, siendo necesarias 7.9 h para un incremento de 1 unidad logarítmica (0h-1d; $r^2 = 0.959$). Las mayores diferencias se registraron a las 24 h (1.22 log ufc/ml). Sin embargo, no se detectó efecto bactericida alguno y a las 8 h ya se había producido un aumento significativo sobre la población inicial de *E. coli* en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado (Tabla 32).

Cuando se considera el comportamiento de los totales se observa que éste es paralelo al de *E. coli* durante el primer día de incubación. Para un incremento de 1 unidad logarítmica en los totales eran necesarias 6.2 h en la leche control y 7.8 h en la leche tratada. A partir de este momento los microorganismos totales crecieron más rápidamente que *E. coli*, presumiblemente debido a la multiplicación de las bacterias lácticas, no pudiéndose detectar ya diferencias significativas entre la leche control y la tratada.

El pH a las 24 horas fue de 6.57 en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado y de 6.35 en la leche control. A los 2 días los valores fueron de 5.85 y 5.79, respectivamente, y a los 3 días de 4.72 en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado y de 4.73 en la leche control.

El sistema lactoperoxidasa disminuyó la velocidad de crecimiento de *E. coli* a la temperatura de 20°C. No se observó un efecto bactericida o bacteriostático en los tiempos de incubación empleados.

Björck et al. (1975) encontraron un efecto bactericida del sistema lactoperoxidasa en suero tratado con el sistema enzimático glucosa/glucosa oxidasa y con tiocianato contra *E. coli* 9703 a 30°C. Sobre una población inicial de 6.5 log ufc/ml se consiguió una reducción de 4 unidades logarítmicas a las 4 h, tras las cuales se inició el crecimiento que no llegó a alcanzar la cifra inicial a las 10 h de incubación. Björck & Claesson (1980) estudiaron las características de la acción bactericida del sistema lactoperoxidasa en un medio semisintético que contenía

Tabla 32. Niveles' de *E. coli* y totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 20°C.

Incubación	<i>E. coli</i>		Totales	
	C	A	C	A
8 h	5.18	4.41 ^a	5.51	4.72 ^a
1 d	8.14	6.92 ^a	8.35	7.46 ^a
2 d	8.59	8.48 ^a	9.08	8.98
3 d	8.83	8.63 ^a	9.69	9.62

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente ($P < 0.01$) inferior al correspondiente a la leche control.

Tabla 33. Niveles de significación de los factores principales sobre los grupos microbianos estudiados a 20°C.

Factor	<i>E. coli</i>	Totales
Activación LP	***	***
Tiempo	***	***

***: $P < 0.001$

5 $\mu\text{g/ml}$ de lactoperoxidasa y 0.25 mM de tiocianato contra *E. coli* 9703 a 37°C. Cuando se añadía peróxido de hidrógeno por encima de 0.10 mM el efecto del sistema lactoperoxidasa era bactericida y se detectaba a las 2 h, mientras que a concentraciones menores su efecto era bacteriostático. El hecho de que el efecto bactericida tuviera la corta duración de 1 h, mientras que en ese tiempo todavía se conservase el 60% de la concentración del ión hipotiocianito, o que dicho ión preparado no enzimáticamente sólo tuviera un efecto bacteriostático a las mismas concentraciones a las cuales era bactericida a través del sistema lactoperoxidasa, muestra que son otros iones de mayor nivel de oxidación producidos por este sistema los responsables del efecto bactericida. Marshall & Reiter (1980) ensayaron varias concentraciones del ión hipotiocianito preparado mediante la activación del sistema lactoperoxidasa y encontraron que hasta la concentración de 5 μM era bactericida para *E. coli* 9703 en un medio sintético, reduciendo la población 10 veces en 2 h a 37°C. La concentración de 20 μM redujo la población de 6 a 3 log ufc/ml a las 4 h de incubación.

Otros investigadores han encontrado una acción bactericida del sistema lactoperoxidasa frente a *E. coli* en leche UHT a 10°C. En este medio, al que se le añade lactoperoxidasa, tiocianato y el sistema glucosa/glucosa oxidasa, se redujo la población inicial de *E. coli* de 10^4 a 10^2 ufc/ml inmediatamente después del tratamiento, y durante los 6 d de almacenamiento no se detectaron células viables de *E. coli* (Earnshaw & Banks, 1989).

Zajac et al. (1983a), tras activar el sistema lactoperoxidasa en leche cruda al inicio de la incubación y a las 24 h (10 y 17°C), a las 48 h (4 y 10°C) y a las 96 h (4°C), observaron el mantenimiento a 4°C de los coliformes en 10^3 ufc/ml durante 104 h, la reducción a 10°C de 10^4 a 10^3 coliformes/ml a las 72 h (aunque la variación inicial de la población de 6.4×10^3 - 1.9×10^4 ufc/ml era alta) y un crecimiento a 17°C de los coliformes que pasaron en 48 h de 10^4 a 10^6 ufc/ml, aunque menor que en la leche control que tenía ya 10^8 ufc/ml. En otro trabajo, Zajac et al. (1983b), en condiciones de activación del sistema lactoperoxidasa similares, encontraron una reducción de aproximadamente 1 unidad logarítmica de dos poblaciones de coliformes a 4°C después de las 48 h. En el caso de la población que crecía más se produjo una segunda reducción a las 96 h.

Por su parte, Farrag et al. (1992) activaron el sistema lactoperoxidasa frente a *E. coli* 0157:H7 en leche cruda y en un medio semisintético a 4 y 30°C. A 4°C

y en leche cruda, ya fuese partiendo de una población inicial alta (8 log ufc/ml) como baja (4 log ufc/ml), se produjo una reducción de los niveles de *E. coli* al activar el sistema lactoperoxidasa, mientras que los controles no crecieron. En el caso de la población inicial de 4 log ufc/ml, la reducción comenzó a las 2 h y a las 120 h *E. coli* había desaparecido por completo. A 30°C y en leche cruda, partiendo de 4 log ufc/ml, se obtuvo una reducción de la población de aproximadamente 1 unidad logarítmica a las 12 h, momento en el que se registró la máxima diferencia entre la leche control y la tratada (4.4 log ufc/ml). Incluso cuando se partió de 8 log ufc/ml de *E. coli*, a las 6 h se había producido un ligero descenso en la población y una diferencia de 1.8 unidades logarítmicas con la leche control. Las células supervivientes crecían a partir de las 6 h o de las 12 h hasta alcanzar a las 24 h de incubación los niveles de la leche control, superiores a 10⁹ células/ml. El comportamiento de *E. coli* en el medio semisintético fue similar al que presentó en la leche cruda a ambas temperaturas.

Sin embargo, otros autores han encontrado únicamente un efecto bacteriostático del sistema lactoperoxidasa sobre *E. coli* durante 24 h. Así, Earnshaw et al. (1990) estudiando el comportamiento de *E. coli* en una fórmula infantil de leche, a la cual se añadía lactoperoxidasa, tiocianato y glucosa/glucosa oxidasa, comprobaron que durante la conservación de la leche a 15°C durante 6 d *E. coli* crecía en el control desde 10⁴ hasta algo más de 10⁸ ufc/ml en 2 d, mientras que con el sistema lactoperoxidasa activado se mantenía 24 h al nivel inicial, tras lo cual se multiplicaba con la misma velocidad que en la leche control llegando a 10⁸ ufc/ml a los 3 d.

3.5. ACTIVACIÓN DEL SISTEMA LACTOPEROXIDASA EN LECHE CRUDA DE CABRA INOCULADA CON ALGUNOS MICROORGANISMOS PATÓGENOS (*LISTERIA MONOCYTOGENES* Y *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*)

3.5.1. Efecto de la activación del sistema lactoperoxidasa en leche cruda de cabra sobre los niveles de *L. monocytogenes* durante la conservación de la leche a temperaturas de refrigeración y a temperatura ambiente

3.5.1.1. Comportamiento de *L. monocytogenes* a temperaturas de refrigeración

Los niveles de las tres cepas de *L. monocytogenes* ensayadas en leche cruda de cabra control y con el sistema lactoperoxidasa activado, mantenida durante 10 d a 4°C y 8°C se recogen en las Tablas 34 y 35, respectivamente. El análisis de varianza realizado detectó los efectos significativos ($P < 0.001$) de la activación del sistema lactoperoxidasa, de la cepa de *L. monocytogenes*, de la temperatura y del tiempo de incubación sobre los niveles de *L. monocytogenes* (Tabla 36). El sistema lactoperoxidasa inhibió el crecimiento de *L. monocytogenes* a 4°C y 8°C.

En la leche control a 4°C, las tres cepas de *L. monocytogenes* crecieron durante el período de incubación, hasta ver incrementados sus niveles a los 10 d en 1.00, 0.93 y 2.03 unidades logarítmicas para las cepas Scott A, 5069 y NCTC 11994, respectivamente. El crecimiento no arrancó hasta pasados los 3-5 d, detectándose incluso un ligero descenso en los niveles bacterianos hasta ese momento. Según las correspondientes regresiones lineales, para que se incrementase en 1 unidad logarítmica el nivel de *L. monocytogenes* la cepa Scott A necesitaba 9.3 d (3d-10d; $r^2 = 0.873$), la cepa 5069 necesitaba 10.5 d (3d-10d; $r^2 = 0.981$) y la cepa NCTC 11994 6.4 d (1d-7d; $r^2 = 0.858$).

Cuando se activó el sistema lactoperoxidasa en leche a 4°C, los niveles de *L. monocytogenes* resultaron ser significativamente inferiores ($P < 0.01$) a sus correspondientes valores en leche control, a partir de los 4, 5 y 3 d para las cepas Scott A, 5069 y NCTC 11994, respectivamente. Después de 10 d, los niveles de *L. monocytogenes* en la leche tratada fueron inferiores en 1.58, 1.53 y 1.10 unidades logarítmicas a los correspondientes en la leche control para las tres cepas arriba mencionadas. Los niveles de las cepas Scott A y 5069 disminuyeron hasta el final de la incubación, mientras que los de la cepa NCTC 11994 lo hicieron tan sólo hasta

Tabla 34. Niveles* de *L. monocytogenes* (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 4°C.

Incubación	Scott A		5069		NCTC 11994	
	C	A	C	A	C	A
1 d	3.92	3.85	3.93	3.83	3.82	3.86
2 d	3.87	3.85	3.81	3.83	3.87	3.87
3 d	3.83	3.82	3.70	3.76	3.95	3.69 ^a
4 d	4.04	3.83 ^a	3.79	3.78	4.08	3.74 ^a
5 d	4.57	3.80 ^a	3.98	3.71 ^a	4.40	3.67 ^a
6 d	4.34	3.75 ^a	4.08	3.63 ^a	4.87	3.76 ^a
7 d	4.77	3.51 ^a	4.46	3.51 ^a	5.49	4.02 ^a
8 d	4.90	3.60 ^a	4.57	3.53 ^a	5.72	4.50 ^a
9 d	4.90	3.44 ^a	4.69	3.34 ^a	5.37	4.90 ^a
10 d	5.00	3.42 ^a	4.93	3.40 ^a	6.03	4.93 ^a

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente ($P < 0.01$) inferior al correspondiente a la leche control.

Tabla 35. Niveles* de *L. monocytogenes* (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 8°C.

Incubación	Scott A		5069		NCTC 11994	
	C	A	C	A	C	A
1 d	3.88	3.86	4.02	3.81 ^a	3.89	3.81
2 d	3.89	3.91	4.05	3.81 ^a	4.15	3.80 ^a
3 d	4.20	3.84 ^a	4.09	3.67 ^a	4.69	3.73 ^a
4 d	4.78	3.82 ^a	4.36	3.58 ^a	5.20	3.72 ^a
5 d	5.17	3.85 ^a	4.99	3.55 ^a	5.61	4.12 ^a
6 d	5.26	3.82 ^a	5.43	3.81 ^a	5.94	4.52 ^a
7 d	5.60	3.66 ^a	5.87	4.00 ^a	6.31	5.63 ^a
8 d	5.99	3.69 ^a	6.01	4.25 ^a	6.44	6.29 ^a
9 d	5.81	3.66 ^a	5.68	4.57 ^a	6.47	6.09 ^a
10 d	5.68	3.82 ^a	5.69	4.85 ^a	6.62	6.21 ^a

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente ($P < 0.01$) inferior al valor correspondiente a la leche control.

Tabla 36. Niveles de significación de los factores principales sobre *L. monocytogenes*, microorganismos totales, lactoperoxidasa y tiocianato a 4°C y 8°C.

Factor	<i>L. monocytogenes</i>	Totales	Lactoperoxidasa	Tiocianato
Activación LP	***	***	***	***
Cepa	***	***	NS	***
Tiempo	***	***	***	***
Temperatura	***	***	***	NS

***, $P < 0.001$

NS, no significativo

los 3 d, tras lo cual se estabilizaron hasta los 6 d y crecieron seguidamente. Según la regresión lineal (5d-10d; $r^2=0.950$) la cepa NCTC 11994 necesitaba 9.9 d en la leche tratada para que aumentase su nivel en 1 unidad logarítmica.

A 8°C en leche control, los niveles de las cepas Scott A, 5069 y NCTC 11994 se incrementaron 1.68, 1.69 y 2.62 unidades logarítmicas durante los 10 d de incubación. Se detectó un ligero descenso para las cepas Scott A y NCTC 11994 el primer día de incubación. Según las regresiones lineales, el tiempo necesario para un incremento de 1 unidad logarítmica era de 4.6 d para la cepa Scott A (2d-5d; $r^2=0.988$), 5.1 d para la cepa 5069 (3d-6d; $r^2=0.980$) y 3.7 d para la cepa NCTC 11994 (1d-4d; $r^2=0.980$).

Al activar el sistema lactoperoxidasa en la leche cruda a 8°C, los niveles de *L. monocytogenes* resultaron ser significativamente más bajos ($P<0.01$) que los correspondientes en la leche control, excepto en los dos primeros días para la cepa Scott A y en el primer día para la cepa NCTC 11994. Después de 10 d de incubación, los niveles se mantuvieron en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado por debajo de los de la leche control en 1.86, 0.84 y 0.41 unidades logarítmicas para las cepas Scott A, 5069 y NCTC 11994 respectivamente. El nivel de *L. monocytogenes* Scott A descendió hasta el día 7, y no se registró un crecimiento apreciable durante el resto de la incubación. Por el contrario, la cepa 5069 inició el crecimiento el día 5 y la cepa NCTC 11994 el día 4. Según las regresiones lineales, en la leche tratada se necesitaban 10.7 d para que la cepa 5069 aumentase 1 unidad logarítmica (5d-10d; $r^2=0.994$) y 6.3 d para que lo hiciese la cepa NCTC 11994 (4d-7d; $r^2=0.926$).

Las ecuaciones de regresión de la reducción de los niveles de *L. monocytogenes* frente a los días de incubación en leche con el sistema lactoperoxidasa activado fueron significativas con $P<0.001$ para todas las cepas a 4°C y para la cepa 5069 a 8°C, mientras que sólo lo fue con $P<0.01$ para las cepas Scott A y NCTC 11994 a 8°C. Se detectó una reducción estadísticamente significativa en los niveles de *L. monocytogenes* al activar el sistema lactoperoxidasa en la leche cruda de cabra a 4°C y 8°C. Esta reducción, de 0.41-1.86 unidades logarítmicas, permite apuntar a una acción bactericida. Desde un punto de vista práctico, la actividad del sistema lactoperoxidasa mostró un efecto ligeramente bactericida, incrementando la fase de latencia o reduciendo la velocidad de crecimiento.

Al comparar el efecto de la activación del sistema lactoperoxidasa a 4°C y a 8°C se detectó una mayor diferencia en los niveles de *L. monocytogenes* tras 10 d de incubación entre la leche control y tratada a la temperatura más baja: 1.53 unidades logarítmicas a 4°C frente a 0.84 a 8°C para la cepa 5069 y 1.10 a 4°C frente a 0.41 a 8°C para la cepa NCTC 11994. En el caso de la cepa Scott A, esta diferencia fue ligeramente superior a 8°C (1.86 log ufc/ml) que a 4°C (1.58 log ufc/ml). El efecto inhibitorio de la activación del sistema lactoperoxidasa sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* tuvo mayor duración a 4°C, extendiéndose a lo largo de toda la incubación para las cepas Scott A y 5069 y durante 3 d para la cepa NCTC 11994, mientras que a 8°C se mantuvo 7 d para la cepa Scott A, 3 d para la cepa 5069 y 1 d para la cepa NCTC 11994.

Las distintas cepas estudiadas no respondieron de la misma manera al sistema lactoperoxidasa. La cepa NCTC 11994 resultó menos inhibida en su crecimiento que las cepas Scott A y 5069, tanto a 4°C como a 8°C.

3.5.1.2. Comportamiento de *L. monocytogenes* a temperatura ambiente

El comportamiento de las tres cepas de *L. monocytogenes* en leche de cabra control y en leche con el sistema lactoperoxidasa activado, durante 3 d de incubación a 20°C, se muestra en la Tabla 37. Se detectaron efectos significativos ($P < 0.001$) de la activación del sistema lactoperoxidasa, de las cepas de *L. monocytogenes* y de los días de incubación sobre los niveles de *L. monocytogenes* (Tabla 38).

Todas las cepas crecieron en la leche control, siendo más rápido el crecimiento de la cepa NCTC 11994 que el de las cepas Scott A y 5069, al igual que a 4°C y 8°C. En estas dos últimas cepas, el crecimiento no comenzó hasta pasadas las 8 h de incubación. Según las regresiones lineales, para un incremento de 1 unidad logarítmica se requerían 17.9 h para la cepa Scott A (0h-1d; $r^2 = 0.882$), 38.9 h para la cepa 5069 (8h-2d; $r^2 = 0.990$) y 10.2 h para la cepa NCTC 11994 (0h-1d; $r^2 = 1.000$).

Al activar el sistema lactoperoxidasa se observó una extensión de la fase de latencia y una menor velocidad de crecimiento, de manera que al cabo de 1 d la leche con el sistema lactoperoxidasa activado tenía niveles 1.18, 0.55 y 0.92 unidades logarítmicas inferiores que la leche control para las cepas Scott A, 5069 y NCTC 11994, respectivamente. No se pudo detectar una actividad bactericida del

Tabla 37. Niveles* de *L. monocytogenes* (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 20°C.

Incubación	Scott A		5069		NCTC 11994	
	C	A	C	A	C	A
8 h	3.97	3.80 ^a	3.93	3.73 ^a	4.80	4.08 ^a
1 d	5.54	4.36 ^a	4.58	4.03 ^a	6.34	5.42 ^a
2 d	5.62	5.03 ^a	5.27	4.25 ^a	6.88	6.49 ^a
3 d	6.18	4.85 ^a	5.71	4.97 ^a	6.78	7.15

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente ($P < 0.01$) inferior al valor correspondiente a la leche control.

Tabla 38. Niveles de significación de los factores principales sobre *L. monocytogenes*, microorganismos totales, lactoperoxidasa y tiocianato a 20°C.

Factor	<i>L. monocytogenes</i>	Totales	Lactoperoxidasa	Tiocianato
Activación LP	***	***	NS	***
Cepa	***	***	***	**
Tiempo	***	***	***	***

***, $P < 0.001$

** , $P < 0.01$

NS, no significativo

sistema lactoperoxidasa sobre *L. monocytogenes* a 20°C, ya que únicamente en dos de las tres cepas tuvo lugar un ligero descenso durante las primeras 8 h, pero sí una acción bacteriostática. La cepa NCTC 11994 fue la menos sensible a la acción bacteriostática del sistema lactoperoxidasa. Según las regresiones lineales, en la leche tratada eran necesarias para un aumento de 1 unidad logarítmica 46.4 h para la cepa Scott A (8h-2d; $r^2=0.996$), 79.1 h para la cepa 5069 (8h-3d; $r^2=0.946$) y 18.6 h para la cepa NCTC 11994 (0h-1d; $r^2=0.922$).

El desarrollo de *L. monocytogenes* en leche cruda de cabra fue superior al observado en leche de vaca por Gaya et al. (1991). Estos autores registraron incrementos en leche de vaca sin activar el sistema lactoperoxidasa de 0.12 y 0.01 unidades logarítmicas para las cepas Scott A y 5069, tras 7 d a 4°C, mientras que la cepa NCTC 11994 experimentó un descenso de 0.33 unidades logarítmicas. Dichos incrementos a 8°C fueron de 0.29, 0.35 y 1.01 unidades logarítmicas para las tres cepas estudiadas.

La actividad inhibitoria del sistema lactoperoxidasa frente a *L. monocytogenes* ha resultado ser inferior en la leche cruda de cabra que en la de vaca (Gaya et al., 1991). Estos autores obtuvieron valores D de 6.8, 6.0 y 4.1 d a 4°C y de 5.0, 4.4 y 4.5 d a 8°C, para las cepas Scott A, 5069 y NCTC 11994, respectivamente. A los 7 d de incubación, los niveles de *L. monocytogenes* en leche con el sistema lactoperoxidasa activado fueron 1.07, 0.70 y 0.87 unidades logarítmicas inferiores a los de leche control para las cepas Scott A, 5069 y NCTC 11994 a 4°C, mientras que a 8°C las diferencias fueron de 1.54, 0.61 y 2.68 para las tres cepas ensayadas. Al activar el sistema lactoperoxidasa en la leche cruda de vaca a 20°C, el efecto bactericida redujo los niveles de *L. monocytogenes* en 0.36 y 0.89 unidades logarítmicas después de 1 d y 3 d de incubación, respectivamente.

Según El-Shenawy et al. (1990) la eficacia del sistema lactoperoxidasa dependía del medio de cultivo y de la temperatura de incubación, con una menor actividad en leche cruda que en un medio semisintético. Estos autores encontraron reducciones en los niveles de *L. monocytogenes* en leche cruda de aproximadamente 1 unidad logarítmica tras 4 h a 35°C y un menor efecto bactericida a 4°C.

La actividad lactoperoxidasa natural de la leche puede controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en la leche cruda, con un efecto bactericida a 35°C de corta duración, de 0 a 2 h (Kamau et al., 1990a). Siragusa & Johnson (1989)

consiguieron inhibir la cepa Scott A añadiendo a la leche estéril todos los componentes del sistema lactoperoxidasa. Se prolongó la fase de latencia y, después de 68 h a 20°C, los niveles de *L. monocytogenes* en la leche tratada fueron 3 unidades logarítmicas más bajos que los de la leche control.

La utilización del sistema enzimático glucosa/glucosa oxidasa para activar el sistema lactoperoxidasa llevó a una reducción de los niveles de la cepa NCTC 11994 de *L. monocytogenes* en leche estéril de 10^4 a 10^2 ufc/ml, después de 6 d de incubación a 10°C (Earnshaw & Banks, 1989). Igualmente, en leche estéril con un aporte continuo de peróxido de hidrógeno, mediante el sistema glucosa/glucosa oxidasa, se han detectado valores D de 5 d a 15°C y de 8 d a 4°C para la inhibición de *L. monocytogenes* (Denis & Ramet, 1989). Según Kamau et al. (1990a), el sistema glucosa/glucosa oxidasa fue más efectivo a la hora de activar el sistema lactoperoxidasa, reforzando su acción bactericida, que una única dosis de peróxido de hidrógeno.

Finalmente, varios autores han demostrado el efecto bacteriostático del sistema lactoperoxidasa sobre *L. monocytogenes* y su dependencia de los medios de cultivo y temperaturas de incubación. Se ha detectado una relación inversa entre la duración de la fase de latencia y la temperatura (Siragusa & Johnson, 1989), así como entre la duración de la fase de latencia y el nivel inicial del inóculo del patógeno (Denis & Ramet, 1989).

3.5.1.3. Niveles de microorganismos totales, lactoperoxidasa y tiocianato

Los niveles de microorganismos totales en la leche a las 0 h fueron de 3.54 unidades logarítmicas, como valor medio. En la Tabla 39 se muestra la evolución, a lo largo de la incubación a temperaturas de refrigeración, de los niveles de totales en la leche cruda de cabra control y tras activar el sistema lactoperoxidasa. Se han detectado, mediante análisis de varianza, efectos significativos ($P < 0.001$) de la activación del sistema lactoperoxidasa, de la temperatura y del tiempo de incubación sobre los niveles de totales a 4°C y 8°C.

A partir de los días 5 y 3 de incubación para 4°C y 8°C, respectivamente, el número de totales en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado se mantuvo aproximadamente una unidad logarítmica por debajo del correspondiente a la leche control. El crecimiento en la leche control se inició a partir de los 2 d a

Tabla 39. Niveles* de microorganismos totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 4°C y a 8°C.

Incubación	Totales 4°C		Totales 8°C	
	C	A	C	A
1 d	4.68	4.76	4.73	4.67
2 d	4.68	4.71	5.08	4.68 ^a
3 d	4.82	4.63 ^a	5.57	4.90 ^a
4 d	5.32	4.89 ^a	6.53	5.36 ^a
5 d	5.96	5.24 ^a	6.70	5.89 ^a
6 d	6.52	5.62 ^a	7.35	6.25 ^a
7 d	6.92	5.95 ^a	7.65	6.64 ^a
8 d	7.34	6.18 ^a	7.96	6.95 ^a
9 d	7.06	6.41 ^a	8.14	7.07 ^a
10 d	7.71	6.58 ^a	8.12	7.31 ^a

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente ($P < 0.01$) inferior al valor correspondiente a la leche control.

4°C y desde el principio de la incubación a 8°C. En cambio, cuando se activó el sistema lactoperoxidasa, los niveles de microorganismos totales se mantuvieron estables durante 3 d de incubación a 4°C y durante 2 d a 8°C. Según las correspondientes regresiones lineales, a 4°C los totales requerían 114.1 h en la leche control y 153.8 h en la leche tratada para incrementar su número en 1 unidad logarítmica, mientras que a 8°C estos tiempos eran de 70.7 h y 115.2 h, respectivamente.

Al igual que en el caso de *L. monocytogenes*, el sistema lactoperoxidasa se mostró menos efectivo en su inhibición del crecimiento de los microorganismos totales en la leche cruda de cabra que en la de vaca (Gaya et al., 1991). En esta última, los totales no crecieron hasta pasados los 5 d a 4°C y 2 d a 8°C en leche con el sistema lactoperoxidasa activado.

A 20°C, la activación del sistema lactoperoxidasa y el tiempo de incubación tuvieron un efecto significativo ($P < 0.001$) sobre los niveles de totales en leche cruda de cabra. Las diferencias entre los niveles en la leche control y tratada fueron de 0.74 y de 0.31 unidades logarítmicas, tras 1 y 3 d de almacenamiento, respectivamente (Tabla 40). Según las correspondientes regresiones lineales, los totales a 20°C requerían 13.6 h en la leche control y 21.5 h en la leche tratada para incrementar su número en 1 unidad logarítmica.

El sistema lactoperoxidasa mostró una acción bacteriostática sobre el crecimiento de los microorganismos totales. A temperaturas de refrigeración, el sistema lactoperoxidasa retardó y redujo el crecimiento. A 8°C, la reducción máxima del crecimiento de los totales se alcanzó antes que a 4°C. A 20°C, el sistema lactoperoxidasa tuvo un pequeño efecto inhibitorio sobre los microorganismos totales, retrasando ligeramente su crecimiento.

Los valores de pH no mostraron diferencias apreciables a 4°C, 8°C ni 20°C entre la leche control y la leche tratada. Las diferencias fueron siempre inferiores a 0.1 unidades. Los valores más bajos de pH fueron de 6.50 tras 10 d de incubación a 4°C, 6.33 tras 10 d a 8°C y 5.25 tras 3 d a 20°C.

El contenido inicial de lactoperoxidasa en la leche cruda antes de la activación del sistema lactoperoxidasa era de 0.81 U/ml. Dicho valor resultó inferior al nivel medio comprobado en la leche de cabra, según nuestros anteriores

Tabla 40. Niveles* de microorganismos totales (log ufc/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 20°C.

Incubación	C	A
8 h	5.00	4.66 ^a
1 d	6.73	5.99 ^a
2 d	8.10	7.78 ^a
3 d	8.87	8.56 ^a

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente ($P < 0.001$) inferior al valor correspondiente a la leche control.

resultados. La explicación a esta diferencia se atribuye al origen de la leche utilizada en esta experiencia, mezcla del ordeño de unos pocos animales procedentes de un rebaño. El análisis de varianza reveló el efecto significativo ($P < 0.001$) de la activación del sistema lactoperoxidasa, de la temperatura y del tiempo de incubación sobre la concentración de lactoperoxidasa a temperaturas de refrigeración. La Tabla 41 muestra las cantidades de lactoperoxidasa en la leche control y activada, durante la incubación a 4°C y 8°C. A ambas temperaturas se observó una reducción de la actividad lactoperoxidasa a lo largo de la incubación, menos acentuada en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado que en la leche control. La lactoperoxidasa resultó ser más estable a 4°C que a 8°C. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Gaya et al. (1991) en la leche de vaca. El crecimiento de los psicrotrofos proteolíticos, mayor a 8°C, podría explicar la relación inversa entre la actividad lactoperoxidasa y la temperatura de incubación.

La concentración de lactoperoxidasa en leche control y leche con el sistema lactoperoxidasa activado, a 20°C, se muestra en la Tabla 42. Dicha concentración resultó influida significativamente ($P < 0.001$) por el tiempo de incubación, con un descenso medio de 0.34 U/ml tras 3 d de incubación.

El contenido de tiocianato anterior a la activación del sistema lactoperoxidasa, en la leche cruda de cabra, fue de 4.51 ppm. A temperaturas de refrigeración, los niveles de tiocianato resultaron influidos significativamente ($P < 0.001$) por la activación del sistema lactoperoxidasa y por el tiempo de incubación, sin detectarse diferencias significativas entre temperaturas. El contenido de tiocianato disminuyó ligeramente en la leche control, a lo largo de la incubación a 4°C y 8°C (Tabla 43). En la leche con el sistema lactoperoxidasa activado se produjo una reducción de aproximadamente 8 ppm durante las primeras 24 h, tras la cual los niveles de tiocianato se mantuvieron constantes durante el resto de la incubación.

A 20°C, los niveles de tiocianato resultaron influidos significativamente ($P < 0.001$) por la activación del sistema lactoperoxidasa y por el tiempo de incubación, con un descenso en leche con el sistema lactoperoxidasa activado durante las primeras 8 h (Tabla 44) similar al detectado durante las primeras 24 h en leche a temperaturas de refrigeración.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que la actividad

Tabla 41. Niveles* de lactoperoxidasa (U/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 4°C y a 8°C.

Incubación	Lactoperoxidasa 4°C		Lactoperoxidasa 8°C	
	C	A	C	A
1 d	0.89	0.89	0.87	0.90
3 d	ND	ND	ND	ND
5 d	0.86	0.89	0.76	0.87 ^a
10 d	0.75	0.80	0.55	0.62

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente ($P < 0.01$) inferior al valor correspondiente a la leche control.

^b Dato no determinado.

Tabla 42. Niveles* de lactoperoxidasa (U/ml) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 20°C.

Incubación	Lactoperoxidasa 20°C	
	C	A
8 h	0.65	0.65
1 d	ND ^a	ND
3 d	0.47	0.48

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato no determinado.

Tabla 43. Niveles* de tiocianato (ppm) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 4°C y a 8°C.

Incubación	Tiocianato 4°C		Tiocianato 8°C	
	C	A	C	A
1 d	4.49	16.96 ^a	4.62	17.01 ^a
3 d	ND	ND	ND	ND
5 d	4.21	17.34 ^a	4.07	17.00 ^a
10 d	4.01	16.53 ^a	3.98	16.23 ^a

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente ($P < 0.01$) superior al valor correspondiente a la leche control.

^b Dato no determinado.

Tabla 44. Niveles* de tiocianato (ppm) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 20°C.

Incubación	Tiocianato 20°C	
	C	A
8 h	3.87	16.02 ^a
1 d	ND ^b	ND
3 d	4.54	15.59 ^a

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente ($P < 0.01$) superior al valor correspondiente a la leche control.

^b Dato no determinado.

bactericida del sistema lactoperoxidasa en leche de cabra persistió 3-9 d a 4°C y 1-7 d a 8°C, según la cepa de *L. monocytogenes* estudiada, lo que dió lugar a una reducción de sus niveles durante la conservación en refrigeración de la leche cruda de cabra. A temperatura ambiente, aunque la actividad del sistema lactoperoxidasa no posee efecto bactericida sobre *L. monocytogenes*, se consiguió retrasar su crecimiento en leche cruda de cabra.

3.5.2. Efecto de la activación del sistema lactoperoxidasa en leche cruda de cabra sobre los niveles de *Staph. aureus* durante la conservación de la leche a temperaturas de refrigeración y a temperatura ambiente

3.5.2.1. Comportamiento de *Staph. aureus* a temperaturas de refrigeración

La actividad lactoperoxidasa y el contenido de tiocianato medios de la leche utilizada en las dos experiencias antes de la activación del sistema lactoperoxidasa fue de 1.55 U/ml y de 4.29 ppm, respectivamente. Los microorganismos totales tenían un nivel medio de 4.34 log ufc/ml.

La evolución de los niveles de *Staph. aureus* y de los microorganismos totales durante la incubación a 4°C y a 8°C de la leche cruda de cabra, inoculada con una cantidad aproximada de 10^4 ufc/ml de *Staph. aureus*, se muestra en las Tablas 45 y 46, respectivamente. Al igual que en el caso de *E. coli*, no se detectó un crecimiento claro de *Staph. aureus* en la leche control a 4°C. La población aumentó de 4 log ufc/ml hasta tan sólo 4.73 log ufc/ml al cabo de 7 d. Se observó un incremento inicial de los niveles de *Staph. aureus* durante los primeros 3 d de incubación, niveles que a partir de este tiempo apenas experimentaron variación. Por su parte, los niveles de *Staph. aureus* en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado siguieron el mismo comportamiento que en la leche control, sin crecimiento sustancial ni diferencias significativas debidas al tratamiento (Tabla 45). A 8°C, tanto en la leche control como en la tratada, el crecimiento fue muy reducido, no mayor que el que se produjo a 4°C (Tabla 46). No se registró diferencia alguna en los niveles de *Staph. aureus* entre la leche control y la leche con el sistema lactoperoxidasa activado a 8°C.

En cuanto a los microorganismos totales, a 4°C y en la leche control, se produjo un crecimiento hasta 7.11 unidades logarítmicas al final de la incubación. Al activar el sistema lactoperoxidasa se observó el crecimiento de los totales en más de 1 unidad logarítmica en el primer día de la incubación, estabilizándose los niveles hasta el cuarto día para volver a aumentar gradualmente y alcanzar 6.51 log ufc/ml a los 7 d. A partir de los 3 d se registraron diferencias significativas en los niveles de microorganismos totales entre la leche control y la tratada (Tabla 45). A 8°C, el crecimiento de la población de totales fue aún mayor, tanto en la leche control como en la leche tratada, aunque en la leche tratada los niveles de totales fueron inferiores significativamente a los de la leche control desde los 2 d (Tabla 46). De acuerdo con

Tabla 45. Niveles* de *Staph. aureus* y totales en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 4°C.

Incubación	<i>Staph. aureus</i>		Totales	
	C	A	C	A
1 d	4.39	4.41	5.47	5.48
2 d	4.51	4.57	5.65	5.55
3 d	4.72	4.71	5.80	5.61 ^a
4 d	4.66	4.68	6.01	5.48 ^a
5 d	4.75	4.72	6.32	5.89 ^a
6 d	4.70	4.69	6.39	6.12 ^a
7 d	4.73	4.68	7.11	6.51 ^a

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente ($P < 0.01$) inferior al correspondiente a la leche control.

Tabla 46. Niveles* de *Staph. aureus* y totales (log ufc/g) en leche cruda de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 8°C.

Incubación	<i>Staph. aureus</i>		Totales	
	C	A	C	A
1 d	4.40	4.36	5.70	5.59
2 d	4.54	4.50	6.55	5.90 ^a
3 d	4.67	4.71	7.04	6.53 ^a
4 d	4.72	4.67	7.13	6.93 ^a
5 d	4.70	4.71	7.82	7.47 ^a
6 d	4.69	4.71	8.00	7.59 ^a
7 d	4.61	4.67	8.58	8.39 ^a

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente ($P < 0.01$) inferior al correspondiente a la leche control.

las correspondientes regresiones lineales, el tiempo necesario para que los totales se incrementasen en 1 unidad logarítmica a 4°C fue de 71.9 h en la leche control y de 119.3 h en la leche tratada, mientras que a 8°C estos tiempos fueron de 27.6 h y 41.0 h, respectivamente.

No se ha observado una multiplicación de *Staph. aureus* de importancia práctica a temperaturas de refrigeración, aunque el análisis de varianza detectó un efecto significativo ($P < 0.001$) del tiempo de incubación sobre los niveles de este microorganismo (Tabla 47). Además, el sistema lactoperoxidasa no inhibió a este patógeno a 4°C ni a 8°C. Así, el análisis de varianza mostró que no había efecto significativo ni de la activación del sistema lactoperoxidasa ni de la temperatura de incubación sobre los niveles de *Staph. aureus*, mientras que sí lo había ($P < 0.001$) en ambos casos sobre los niveles de totales (Tabla 47). Esto último se puede explicar por la acción del sistema lactoperoxidasa sobre los microorganismos psicrotrofos que crecen a estas temperaturas. Sin embargo, esta inhibición sobre los totales fue menor que en el correspondiente experimento frente a *E. coli*, lo que demuestra la relación entre la efectividad del sistema lactoperoxidasa y la composición de las distintas poblaciones que crecen e interaccionan en la leche.

Los valores de pH no resultaron influidos significativamente por la activación del sistema lactoperoxidasa. A 4°C se mantuvieron entre 6.75 y 6.62 y a 8°C entre 6.67 y 6.34 durante los 7 d de incubación. Sí se detectó un efecto significativo del tiempo ($P < 0.01$) y de la temperatura ($P < 0.001$) sobre el valor del pH.

3.5.2.2. Comportamiento de *Staph. aureus* a temperatura ambiente

La evolución de los niveles de *Staph. aureus* durante la conservación a 20°C de la leche cruda de cabra inoculada con este patógeno, activando o no el sistema lactoperoxidasa, se muestra en la Tabla 48. Del análisis de varianza se detectaron efectos altamente significativos del tiempo de incubación ($P < 0.001$) sobre los niveles de *Staph. aureus* y de totales, así como de la activación del sistema lactoperoxidasa sobre los segundos (Tabla 49). Por su parte, la activación del sistema lactoperoxidasa sobre los niveles de *Staph. aureus* tuvo un efecto significativo ($P < 0.01$).

En la leche control a 20°C se produjo un crecimiento continuado de *Staph. aureus*, que dio lugar a un aumento de 2.5 unidades logarítmicas a los 3 d de

Tabla 47. Niveles de significación de los factores principales sobre los grupos microbianos estudiados a 4 y 8°C.

Factor	<i>Staph. aureus</i>	Totales
Activación LP	NS	***
Tiempo	***	***
Temperatura	NS	***

***: $P < 0.001$

NS: no significativo.

Tabla 48. Niveles* de *Staph. aureus* y totales (log ufc/g) en leche de cabra control (C) y con el sistema lactoperoxidasa activado (A) a 20°C.

Incubación	<i>Staph. aureus</i>		Totales	
	C	A	C	A
8 h	4.50	4.49	6.84	6.35 ^a
1 d	5.34	5.12 ^a	7.85	7.65 ^a
2 d	6.15	6.16	9.00	8.92
3 d	6.49	6.47	9.31	9.37

* Valores medios de dos experiencias, con dos determinaciones por muestra.

^a Dato significativamente ($P < 0.01$) inferior al correspondiente a la leche control.

Tabla 49. Niveles de significación de los factores principales sobre los grupos microbianos estudiados a 20°C.

Factor	<i>Staph. aureus</i>	Totales
Activación LP	**	***
Tiempo	***	***

***: $P < 0.001$

**: $P < 0.01$

incubación. Al activar el sistema lactoperoxidasa sólo se obtuvieron niveles de *Staph. aureus* significativamente menores que los de la leche control después de 1 d, produciéndose el mismo crecimiento durante el resto de la incubación. Según las correspondientes regresiones lineales, para que aumentasen 1 unidad logarítmica los niveles de *Staph. aureus* eran necesarias 17.7 h en la leche control (0h-1d; $r^2=0.998$) y 20.8 h en la leche tratada (0h-1d; $r^2=0.986$). Los microorganismos totales crecieron rápidamente en la leche control a 20°C con un incremento de 2 unidades logarítmicas a las 8 h. El sistema lactoperoxidasa inhibió ligeramente el crecimiento de los totales, con niveles más bajos a las 8 h y 1 d que los correspondientes a los de la leche control. Sin embargo, el efecto fue pequeño y a los 2-3 d ya no hubo diferencias entre la leche control y la leche con el sistema lactoperoxidasa activado (Tabla 48). De acuerdo con las regresiones lineales, hacían falta 4.8 h en la leche control y 6.6 h en la leche tratada para que los totales aumentasen 1 unidad logarítmica a 20°C.

No se encontraron diferencias significativas en los valores de pH entre la leche control y la leche con el sistema lactoperoxidasa activado. A las 24 h la leche control presentaba un valor de 6.30, siendo 6.06 el pH de la leche con el sistema lactoperoxidasa activado. A los 2 d los valores fueron de 4.54 y 4.93 respectivamente para la leche control y la leche tratada, y de 4.23 y 4.34 a los 3 d de incubación a 20°C.

Aunque estadísticamente significativo, el sistema lactoperoxidasa no tuvo una acción inhibitoria de interés práctico sobre *Staph. aureus* durante la conservación de la leche cruda de cabra a la temperatura de 20°C. No se ha podido detectar la acción bacteriostática que era de esperar. El hecho de que el crecimiento de *Staph. aureus* fuese relativamente lento incluso a 20°C, comparándolo por ejemplo con el de *E. coli* en el correspondiente experimento, puede explicar el débil efecto encontrado del sistema lactoperoxidasa. El Shenawy et al. (1990) sugirieron que la acción del sistema lactoperoxidasa era mayor en condiciones favorables para la multiplicación celular que cuando las células se encontraban en fase de latencia o multiplicándose lentamente.

Kamau et al. (1990a) activaron el sistema lactoperoxidasa frente a *Staph. aureus* en leche de vaca a 10°C y 37°C. A 10°C, la población inicial de 4 log ufc/ml se mantuvo sin crecer en la leche control durante 48 h, para luego hacerlo gradualmente hasta 6 log ufc/ml a los 6 d de incubación. Cuando se activó el sistema

lactoperoxidasa el comportamiento fue el mismo pero el crecimiento era menor. El tiempo necesario para llegar a la mitad de los niveles máximos aumentó en 36 h en la leche tratada con respecto a la leche control. A 37°C, mientras que en la leche control se llegó a 10^8 ufc/ml a las 8 h, en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado se obtuvo una reducción de aproximadamente 0.5 log ufc/ml a las 2 h, tras las cuales la población inició su multiplicación a un ritmo semejante al de la leche control, alcanzando 10^7 ufc/ml a las 8 h y 10^8 ufc/ml a las 14 h de incubación.

4. CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

- Primera** El contenido microbiano medio de la leche cruda de cabra (expresado en log ufc/ml) fue el siguiente: 5.61 microorganismos totales, 3.91 Gram negativos, 2.83 psicrotrofos Gram negativos, 2.82 enterobacteriáceas, 2.80 coliformes, 2.37 coliformes fecales, 4.18 estafilococos y 2.67 estafilococos coagulasa positivos.
- Segunda** Únicamente el 60% de las muestras eran aptas para su industrialización con tratamiento térmico, y sólo el 54% si su destino era la elaboración de productos a base de leche cruda. Se requiere por consiguiente una mejora de la calidad microbiológica de la leche de cabra.
- Tercera** La actividad lactoperoxidasa media de la leche cruda de cabra durante la lactación fue de 1.55 U/ml y el nivel medio de tiocianato de 4.03 ppm. Se comprobó la influencia significativa del individuo, raza y tiempo de lactación sobre los niveles de ambos componentes.
- Cuarta** La activación del sistema lactoperoxidasa en leche cruda de cabra inhibió el desarrollo de microorganismos totales y psicrotrofos a temperaturas de refrigeración. No se comprobó su efecto bactericida ni la extensión de la fase de latencia. A temperatura ambiente, el sistema lactoperoxidasa no inhibió el desarrollo de microorganismos totales, aunque sí el de los psicrotrofos.
- Quinta** El sistema lactoperoxidasa resultó bactericida para *Pseudomonas fluorescens* a temperaturas de refrigeración y temperatura ambiente. La activación del sistema lactoperoxidasa permitió el control del desarrollo de *Ps. fluorescens* en leche refrigerada durante 5-6 días a 4°C y 3-4 días a 8°C.
- Sexta** El sistema lactoperoxidasa inhibió el crecimiento de *Escherichia coli* a 8°C y a 20°C. Se comprobó un retraso en el crecimiento de dicho microorganismo en la leche con el sistema lactoperoxidasa activado a estas temperaturas. El desarrollo de *E. coli* a 4°C fue muy reducido.

- Séptima** El sistema lactoperoxidasa presentó un efecto ligeramente bactericida sobre *Listeria monocytogenes* a temperaturas de refrigeración. Sus niveles se redujeron hasta el día 9 a 4°C y hasta el día 7 a 8°C, según la cepa. A temperatura ambiente no se registró un efecto bactericida del sistema lactoperoxidasa sobre *L. monocytogenes* aunque se observó un retraso en su crecimiento.
- Octava** La activación del sistema lactoperoxidasa no afectó al comportamiento de *Staphylococcus aureus* a temperaturas de refrigeración, al ser el desarrollo de este microorganismo muy reducido. A temperatura ambiente, aunque el crecimiento también fue reducido, se detectó una disminución significativa de los niveles de *Staph. aureus* debida a la activación del sistema lactoperoxidasa.

5. BIBLIOGRAFIA

5. BIBLIOGRAFÍA

- ADAMSON, M. & PRUITT, K.M. 1981 Lactoperoxidase-catalyzed inactivation of hexokinase. *Biochimica et Biophysica Acta* **658** 238-247.
- AHRNÉ, L. & BJÖRCK, L. 1985 Effect of the lactoperoxidase system on lipoprotein lipase activity and lipolysis in milk. *Journal of Dairy Research* **52** 513-520.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (A.P.H.A.) 1978 Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 14^a edición (Editor: Marth, E.H.) A.P.H.A., Washington.
- AUNE, T.M. & THOMAS, E.L. 1977 Accumulation of hypothiocyanite ion during peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate ion. *European Journal of Biochemistry* **80** 209-214.
- AUNE, T.M. & THOMAS, E.L. 1978 Oxidation of protein sulfhydryls by products of peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate ion. *Biochemistry* **17** 1005-1010.
- BAIRD-PARKER, A.C. 1979 Methods for identifying staphylococci and micrococci. En: *Identification methods for microbiologists*. (Editores: Skiner, F.A. & Lovelock, D.W.) Society for Applied Bacteriology, Technical Series **14**, Academic Press, London.
- BANKS, J.G. & BOARD, R.G. 1985 Preservation by the lactoperoxidase system (LP-S) of a contaminated infant milk formula. *Letters in Applied Microbiology* **1** 81-85.
- BARBOSA, M. & MIRANDA, R. 1986 Physico-chemical and microbiological characteristics of goat milk in Portugal. *Bulletin of the International Dairy Federation* **202** 84-89.
- BAUTISTA, L., BERMEJO, M.P. & NUÑEZ, M. 1986 Seasonal variation and characterization of Micrococcaceae present in ewe's raw milk. *Journal of Dairy Research* **53** 1-5.
- BEUMER, R.R., NOOMEN, A., MARIJS, J.A. & KAMPELMACHER, E.H. 1985 Antibacterial action of the lactoperoxidase system on *Campylobacter jejuni* in cow's milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **39** 107-114.
- BIBI, W. & BACHMANN, M.R. 1990 Antibacterial effect of the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system on the growth of *Listeria* spp. in skim milk. *Milchwissenschaft* **45** 26-28.

- BJÖRCK, L. 1978 Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychrotrophic bacteria in milk. *Journal of Dairy Research* **45** 109-118.
- BJÖRCK, L. & CLAESSON, O. 1980 Correlation between the concentration of hypothiocyanite and antibacterial effect of the lactoperoxidase system against *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Science* **63** 919-922.
- BJÖRCK, L., CLAESSON, O. & SCHULTHESS, W. 1979 The lactoperoxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide system as a temporary preservative for raw milk in developing countries. *Milchwissenschaft* **34** 726-729.
- BJÖRCK, L., ROSÉN, C.G., MARSHALL, V.M. & REITER, B. 1975 Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against pseudomonads and other gram-negative bacteria. *Applied Microbiology* **30** 199-204.
- BLASER, M.J., LAFORCE, F.M. & WILSON, N.A. 1980 Reservoirs for human Campylobacteriosis. *Journal of Infection and Disease* **141** 665-669.
- BORCH, E., WALLENTIN, C., ROSÉN, M. & BJÖRCK, L. 1989 Antibacterial effect of the lactoperoxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide system against strains of *Campylobacter* isolated from poultry. *Journal of Food Protection* **52** 638-641.
- BOROŠ, V. 1986 Influence of the lactation period on variations in the levels of certain components of bulked goat's milk. *Bulletin of the International Dairy Federation* **202** 81-83.
- BOULANGÉ, M. 1959 Fluctuation saisonnière du taux des thiocyanates dans le lait frais de vache. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie* **153** 2019-2020.
- BRADSHAW, J.G., PEELER, J.T., CORWIN, J.J., HUNT, J.M. & TWEDT, R.M. 1987 Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy products. *Journal of Food Protection* **50** 543-544.
- CARLSSON, J., IWAMI, Y. & YAMADA, T. 1983 Hydrogen peroxide excretion by oral streptococci and effect of lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. *Infection and Immunity* **40** 70-80.
- CARLSTRÖM, A. 1969 *Acta Chemica Scandinavica* **23** 185 (Citado por Paul y Ohlsson 1985).
- CHAKRABORTY, B.K., CHAUDRY, S.S., ALEX, K.A., JACOB, G. & SONI, G.J. 1986 Application of the lactoperoxidase system for preserving buffalo milk produced in Indian villages. *Milchwissenschaft* **41** 16-19.

- CHUBB, R. & ORCHARD, F. 1985 The bacteriological quality of raw goat's milk. *Australian Journal of Dairy Technology* **40** 22-26.
- CORISCO, S., BERMUDEZ, M.E. & ASENSIO, M.A. 1990 Evolución de la flora microbiana del queso de Acehuche durante la maduración. *VII Reunión Científica Microbiología de Alimentos* **25**, Barcelona.
- COX, J.M. & MACRAE, I.C. 1989 A survey of the bacteriological quality of raw and pasteurized goat milk produced in Queensland. *Australian Journal of Dairy Technology* **44** 41-43.
- DE BUYSER, M.L., DILASSER, F., HUMMEL, R. & BERGDOLL, M.S. 1987 Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production by staphylococci isolated from goats milk. *International Journal of Food Microbiology* **5** 301-309.
- DENIS, F. & RAMET, J.P. 1989 Antibacterial activity of the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in trypticase soy broth, UHT milk and french soft cheese. *Journal of Food Protection* **52** 706-711.
- DOMINGUEZ, R.L., GARAYZABAL, J.F., BOLAND, J.A., FERRI, E.R. & FERNANDEZ, G.S. 1985 Isolation de micro-organismes du genre *Listeria* à partir de lait cru destiné à la consommation humaine. *Canadian Journal of Microbiology* **31** 938-941.
- DONNELLY, C.W. & BRIGGS, E.H. 1986 Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. *Journal of Food Protection* **49** 994-998.
- DONNELLY, C.B., LESLIE, J.E., BLACK, L.A. & LEWIS, K.H. 1967 Serological identification of enterotoxigenic staphylococci from cheese. *Applied Microbiology* **15** 1382.
- DOYLE, M.P., GLASS, K.A., BEERY, J.T., GARCIA, G.A., POLLARD, D.J. & SCHULTZ, R.D. 1987 Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. *Applied and Environmental Microbiology* **53** 1433-1438.
- EARNSHAW, R.G. & BANKS, J.G. 1989 A note on the inhibition of *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 in milk by an activated lactoperoxidase system. *Letters in Applied Microbiology* **8** 203-205.
- EARNSHAW, R.G., BANKS, J.G., DEFRISE, D. & FRANCOITTE, C. 1989 The preservation of Cottage cheese by an activated lactoperoxidase system. *Food Microbiology* **6** 285-288.

- EARNSHAW, R.G., BANKS, J.G., FRANCO, C. & DEFRISE, D. 1990 Inhibition of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in an infant milk formula by an activated lactoperoxidase system. *Journal of Food Protection* **53** 170-172.
- EL-SHENAWY, M.A., GARCIA, H.S. & MARTH, E.H. 1990 Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* by the lactoperoxidase system in raw milk, buffer or a semi-synthetic medium. *Milchwissenschaft* **45** 638-641.
- FARRAG, S.A., EL-GAZZAR, F.E. & MARTH, E.H. 1992 Use of the lactoperoxidase system to inactivate *Escherichia coli* 0157:H7 in a semi-synthetic medium and in raw milk. *Milchwissenschaft* **47** 15-17.
- FARRAG, S.A., EL-GAZZAR, F.E. & MARTH, E.H. 1992 Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by the lactoperoxidase system in a semi-synthetic medium and in raw milk. *Milchwissenschaft* **47** 95-98.
- FATOUROS, T. 1986 The collection of goat's and ewe's milk and the problems involved. *Bulletin of the International Dairy Federation* **202** 73-75.
- FERNANDEZ, J.F., DOMINGUEZ, L., VAZQUEZ, J.A., RODRIGUEZ, E.F., BRIONES, V., BLANCO, J.L. & SUAREZ, G. 1987 Survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk treated in a pilot plant size pasteurizer. *Journal of Applied Bacteriology* **63** 533-537.
- FLEMING, D.W., COCHI, S.L., MACDONALD, K.L., BRONDUM, J., HAYES, P.S., PLIKAYTIS, B.D., HOLMES, M.B., AUDURIER, A., BROOME, C.V. & REINGOLD, A.L. 1985 Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New England Journal of Medicine* **312** 404-407.
- FONTECHA, J., PELAEZ, C., JUAREZ, M., REQUENA, T., GOMEZ, C. & RAMOS, M. 1990 Biochemical and microbiological characteristics of artisanal hard goat's cheese. *Journal of Dairy Science* **73** 1150-1157.
- GAYA, P., MEDINA, M. & NUÑEZ, M. 1987 Enterobacteriaceae, coliforms, faecal coliforms and salmonellas in raw ewe's milk. *Journal of Applied Bacteriology* **62** 321-326.
- GAYA, P., MEDINA, M. & NUÑEZ, M. 1991 Effect of the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* behavior in raw milk at refrigeration temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* **57** 3355-3360.
- GOMEZ, R., FERNANDEZ-SALGUERO, J. & SANJUAN, E. 1991 Caracterización química del queso Palmero. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* **31**.

- GOTHEFORS, L. & MARKLUND, S. 1975 Lactoperoxidase activity in human milk and in saliva of new born infants. *Infection and Immunity* **11** 1210-1215.
- GRAPPIN, R., JENNET, R., PILLET, R. & TOQUIN, A. 1981 A study of goat's milk. I. Contents of fat, protein and nitrogenous fractions. *Lait* **61** 117-133.
- GREENWOOD, M.H., ROBERTS, D. & BURDEN, P. 1991 The occurrence of *Listeria* species in milk and dairy products: a national survey in England and Wales. *International Journal of Food Microbiology* **12** 197-206.
- GRIFFITHS, M.W. 1986 Use of milk enzymes as indices of heat treatment. *Journal of Food Protection* **49** 696-705.
- GUIRGUIS, N. & HICKEY, M.W. 1987 Factors affecting the performance of thermophilic starters. 2. Sensitivity to the lactoperoxidase system. *Australian Journal of Dairy Technology* **42** 14-26.
- GUPTA, V.K., PATEL, R.S., PATIL, G.R., SINGH, S. & MATHUR, B.N. 1986 Preservation of milk with hydrogen peroxide and lactoperoxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide systems. *Indian Journal of Dairy Science* **39** 269-276.
- GUTIERREZ, L.M., CARBALLO, J., VIDAL, I., GONZALEZ PRIETO, J., MARTIN SARMIENTO, R. & BERNARDO, A. 1988 Evolución de los principales grupos de microorganismos durante la elaboración y maduración del queso de Valdeteja. *Anales de la Facultad de Veterinaria de León* **34** 119-126.
- HANSEN, F.S. 1924 The bactericidal property of milk. *British Journal of Experimental Pathology* **5** 271-280.
- HÄRNULV, B.G. & KANDASAMY, C. 1982 Increasing the keeping quality of raw milk by activation of the lactoperoxidase system. Results from Sri Lanka. *Milchwissenschaft* **37** 454-457.
- HARRIGAN, W.F. & MC CANCE, M.E. 1976 Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press, London.
- HARRIS, N.V., KIMBALL, T., WEISS, N.S. & NOLAN, C. 1986 Dairy products, produce and other non-meat foods as possible sources of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* enteritis. *Journal of Food Protection* **49** 347-351.
- HARVEY, J. & GILMOUR, A. 1988 Isolation and characterization of staphylococci from goats milk produced in Northern Ireland. *Letters in Applied Microbiology* **7** 79-82.

- HINCKLEY, L.S. 1991 Quality standards for goat milk. *Dairy. Food and Environmental Sanitation* **11** 511-512.
- HOGG, D. & JAGO, G.R. 1970 The antibacterial action of lactoperoxidase: the nature of the bacterial inhibitor. *Biochemical Journal* **117** 779-790.
- HOOGENDOORN, H. 1976 The inhibitory action of the lactoperoxidase system on *Streptococcus mutans* and other microorganisms. En: *Proceedings Microbial Aspects of Dental Caries* (Editores: Stiles, H.M., Loesche, W.J. & O'Brien, T.C.) vol 1 Information Retrieval Inc., Washington.
- HOOGENDOORN, H., PIESSENS, J.P., SCHOLTES, W. & STODDARD, L.A. 1977 Hypothiocyanite ion; the inhibitor formed by the system lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. *Caries Research* **11** 77-84.
- IBRAHIM, G.F. 1981 A simple sensitive method for determining staphylococcal thermonuclease in cheese. *Journal of Applied Bacteriology* **51** 307-312.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION 1988 Code of practice for preservation of raw milk by lactoperoxidase system. *Bulletin of the International Dairy Federation* **234** 15 pp.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION 1991 Significance of the indigenous antimicrobial agents of milk to the dairy industry. *Bulletin of the International Dairy Federation* **264** 2-19.
- JAGO, G.R. & MORRISON, M. 1962 Anti-streptococcal activity of lactoperoxidase. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* **3** 585-588.
- JAOUEN, J.L. LE 1972 Characteristic and composition of goat's milk from zootechnical point of view and as regards of its utilization. II Seminario Nacional de Ovinos y Caprinos, Maracaibo.
- JENNESS, R. 1980 Composition and characteristics of goat milk: review 1968-1979. *Journal of Dairy Science* **63** 1605-1630.
- JENSEN, N. & HUGHES, D. 1980 Public health aspects of raw goats' milk produced throughout New South Wales. *Food Technology in Australia* **32** 336-341.
- JUAREZ, M. & RAMOS, M. 1986 Physico-chemical characteristics of goat's milk as distinct from those of cow's milk. *Bulletin of the International Dairy Federation* **202** 54-67.
- JUAREZ, M., RAMOS, M. & MARTIN-HERNANDEZ, M.C. 1991 Quesos españoles de leche de cabra. *Fundación de Estudios Lácteos (FESLAC)*.

- KALOGRIDOU-VASSILIADOU, D. 1991 Mastitis-related pathogens in goat milk. *Small Ruminant Research* **4** 203-212.
- KAMAU, D.N., DOORES, S. & PRUITT, K.M. 1990a Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk. *Journal of Food Protection* **53** 1010-1014.
- KAMAU, D.N., DOORES, S. & PRUITT, K.M. 1990b Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system. *Applied and Environmental Microbiology* **56** 2711-2716.
- KAMAU, D.N., DOORES, S. & PRUITT, K.M. 1991 Activation of the lactoperoxidase system prior to pasteurization for shelf-life extension of milk. *Milchwissenschaft* **46** 213-214.
- KAMAU, D.N. & KROGER, M. 1984 Preservation of raw milk by treatment with hydrogen peroxide and by activation of the lactoperoxidase (LP) system. *Milchwissenschaft* **39** 658-661.
- KERN, R., WILDBRETT, G. & KIERMEIER, F. 1962 Abhängigkeit der Peroxidase- Aktivität in Milch von Sexual- zyklus beim Rind. *Zeitschrift für Naturforschung* **186** 1082.
- KIERMEIER, F. & KAYSER, C. 1960a Milk peroxidase. I. Variations in the peroxidase activity of cow's milk. *Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und- Forschung* **112** 481-498.
- KIERMEIER, F. & KAYSER, C. 1960b Milk peroxidase. IV. Inactivation of milk peroxidase by micro-organisms. *Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und- Forschung* **113** 203-213.
- KING, E.O., WARD, M.K. & RANEY, D.E. 1954 Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **44** 301.
- KLOBASA, F. & SENFT, B. 1970 Untersuchungen über das fettsäurespektrum im milchfett von ziegen. *Milchwissenschaft* **25** 453.
- KOHLER, H., HUWILER, M. & JENZER, H. 1986 Irreversible inactivation of lactoperoxidase by excess hydrogen peroxide involving cleavage of the catalytic heme moiety. En: *Frontiers in Thyroidology* (Editores: Medeiros-Neto, G. & Gaitan, E.) vol 1 Plenum Publishing Corp., New York.
- KORHONEN, H. 1973 Untersuchungen zur Bakterizidie der Milch und Immunisierung der bovinen Milchdrüse. Ph.D. Thesis, University of Helsinki, Finland (Citado por Reiter & Härnolv 1984).

- KOVACKS, N. 1956 Identification of *Pseudomonas pyocianea* by the oxidase reaction. *Nature* **178** 703.
- LARA, R., MENDOZA, A., DE LA CRUZ, I. & GARCIA, H.S. 1987 Effect of the lactoperoxidase system on yield and characteristics of fresh-type cheese. *Milchwissenschaft* **42** 773-775.
- LAW, B.A. & JOHN, P. 1981 Effect of the lactoperoxidase bactericidal system on the formation of the electro-chemical proton gradient in *E. coli*. *FEMS Microbiology Letters* **10** 67-70.
- LINNAN, M.J., MASCOLA, L., LOU, X.D., GOULET, V., MAY, S., SALMINEN, C., HIRD, D., YONEKURA, M.L., HAYES, P., WEAVER, R., AUDURIER, A., PLIKAYTIS, B.D., FANNIN, S.L., KLEKS, A. & BROOME, C.V. 1988 Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *New England Journal of Medicine* **319** 823-828.
- LOVETT, J., FRANCIS, D.W. & HUNT, J.M. 1987 *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence and pathogenicity. *Journal of Food Protection* **50** 188-192.
- MANDEL, I.D., BEHRMAN, R., LEVY, R. & WEINSTEIN, D. 1983 The salivary lactoperoxidase system in caries-resistant and susceptible adults. *Journal of Dental Research* **62** 922-925.
- M.A.P.A. 1993 *Anuario de Estadística Agraria 1990*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- MARAVAL, B. & VIGNON, B. 1982 Mineral composition of goat's milk in early lactation. *Milchwissenschaft* **37** 464-466.
- MARCOS, A., FERNANDEZ-SALGUERO, J., ESTEBAN, M.A., LEON, F., ALCALA, M. & BELTRAN DE HEREDIA, F.H. 1984 El queso de los Ibóres: composición química, valor nutritivo y estabilidad. *Industrias Lácteas Españolas* **64** 15-20.
- MARCOS, A., MILLAN, R., ESTEBAN, M.A., ALCALA, M. & FERNANDEZ-SALGUERO, J. 1983 Chemical composition and water activity of spanish cheeses. *Journal of Dairy Science* **66** 2489-2493.
- MARISCAL, J.L. 1987 Calidad microbiológica de la leche de cabra. *Revista de Sanidad e Higiene Pública* **61** 483-497.
- MARSHALL, V.M. 1978 In vitro and in vivo studies on the effect of the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system on *Escherichia coli*. Ph.D. Thesis, University of Reading, England (Citado por Marshall & Reiter 1980).

- MARSHALL, V.M. 1978 In vitro and in vivo studies on the effect of the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system on *Escherichia coli*. Ph.D. Thesis, University of Reading, England (Citado por Marshall & Reiter 1980).
- MARSHALL, V.M., COLE, W.M. & BRAMLEY, A.J. 1986 Influence of the lactoperoxidase system on susceptibility of the udder to *Streptococcus uberis* infection. *Journal of Dairy Research* **53** 507-514.
- MARSHALL, V.M., PHILIPS, S.M. & TURVEY, A. 1982 Isolation of a hydrogen peroxide-producing strain of *Lactobacillus* from calf gut. *Research in Veterinary Science* **32** 259-260.
- MARSHALL, V.M. & REITER, B. 1980 Comparison of the antibacterial activity of the hypothiocyanite anion towards *Streptococcus lactis* and *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* **120** 513-516.
- MARTIN-HERNANDEZ, M.C. & JUAREZ, M. 1989 Retention of main and trace elements in four types of goat cheese. *Journal of Dairy Science* **72** 1092-1097.
- MARTIN-HERNANDEZ, M.C., JUAREZ, M., RAMOS, M. & MARTIN-ALVAREZ, P.J. 1988 Composición de la leche de cabra de razas Murciana y Granadina. *Anales de Bromatología* **XL-2** 237-248.
- MARTIN-HERNANDEZ, M.C., MARKWIJK, B.W. & VREEMAN, H.J. 1990 Isolation and properties of lactoperoxidase from bovine milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **44** 213-231.
- MARTINEZ, C.E., MENDOZA, P.G., ALACRON, F.J. & GARCIA, H.S. 1988 Reactivation of the lactoperoxidase system during raw milk storage and its effect on the characteristics of pasteurized milk. *Journal of Food Protection* **51** 558-561.
- MAS MAYORAL, M., TIMON ESTEBAN, J. & GONZALEZ CRESPO, J. 1991 Queso de los Ibores: Caracterización productiva, fisico-química y microbiológica. *Archivos de Zootecnia* **40** 103-113.
- MCDONALD, J.S. & ANDERSON, A.J. 1981 Experimental infection of bovine mammary glands with *Streptococcus uberis* during the non-lactating period. *American Journal of Veterinary Research* **42** 465.
- MEHANNA, N.M. & HEFNAWY, S.A. 1988 Effect of thiocyanate-lactoperoxidase-hydrogen peroxide system on the manufacture and properties of yoghurt. *Egyptian Journal of Dairy Science* **16** 55-63.

- MEDINA, M., GAYA, P. & NUÑEZ, M. 1992 Gredos goat's milk cheese: microbiological and chemical changes throughout ripening. *Journal of Dairy Research* **59** 563-566.
- MENS, P. LE 1985 Propriétés physico-chimiques nutritionnelles et chimiques. En: *Laits et Produits Laitiers. Vache, Brébis, Chèvre. I.* (Editor: Luquet, F.M.) Apria, Paris.
- MICKELSON, M.N. 1966 Effect of lactoperoxidase and thiocyanate on the growth of *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae* in a chemically defined culture medium. *Journal of General Microbiology* **43** 31-43.
- MICKELSON, M.N. 1976 Effects of nutritional characteristics of *Streptococcus agalactiae* on inhibition of growth by lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide in chemically defined culture medium. *Applied and Environmental Microbiology* **32** 238-244.
- MICKELSON, M.N. 1977 Glucose transport in *Streptococcus agalactiae* and its inhibition by lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology* **132** 541-548.
- MICKELSON, M.N. 1979 Antibacterial action of lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide on *Streptococcus agalactiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **38** 821-826.
- MONNOM, D., PRIEELS, J.P., DELAHAUT, P. & KAECKENBEECK, A. 1989 Le système lactoperoxydase. *Annales de Médecine Vétérinaire* **133** 125-140.
- MORAND-FEHR, P. & FLAMANT, J.C. 1983 Caractéristiques des laits de brébis et de chèvres. En: *International Symposium on production of sheep and goat in Mediterranean Area* 384, Ankara.
- MORAND-FEHR, P. & SAUVANT, D. 1980 Composition and yield of goat milk as affected by nutritional manipulation. *Journal of Dairy Science* **63** 1671-1680.
- MOSSEL, D.A., MENGERINK, W.H. & SCHOLTS, H.H. 1962 Use of a modified McConkey agar medium for the selective growth and enumeration of Enterobacteriaceae. *Journal of Bacteriology* **84** 381.
- NUÑEZ, J.A., CHAVARRI, F.J. & NUÑEZ, M. 1984 Psychrotrophic bacterial flora of raw ewe's milk, with particular reference to Gram negative rods. *Journal of Applied Bacteriology* **57** 23-29.

- ORAM, J.D. & REITER, B. 1966 The inhibition of streptococci by lactoperoxidase, thiocyanate and hydrogen peroxide. I. The effect of the inhibitory system on susceptible and resistant strains of group N streptococci. *Biochemical Journal* **100** 373-381.
- PARK, Y.W. 1990 Nutrient profiles of commercial goat milk cheeses in the United States. *Journal of Dairy Science* **73** 3059-3067.
- PARKASH, S. & JENNESS, R. 1968 The composition and characterization of goat's milk. A review. *Dairy Science Abstracts* **30** 67-87.
- PAUL, K.G. & OHLSSON, P.I. 1985 The chemical structure of lactoperoxidase. En: *The Lactoperoxidase System: chemistry and biological significance*. (Editores: Pruitt, K.M. & Tenovuo, J.O.) Immunology Series vol **27** Marcel Dekker, New York.
- PEREIRA, J.L., SALZBERG, S.P. & BERGDOLL, M.S. 1982 Effect of temperature, pH, sodium chloride concentrations on production of staphylococcal enterotoxins A and B. *Journal of Food Protection* **45** 1306-1309.
- PIIRONEN, E. & VIRTANEN, A.I. 1963 The effect of thiocyanate in nutrition on the iodine content of cow's milk. *Zeitschrift fur Ernährungswissenschaft* **3** 140-147.
- PORTER, I.A. & REID, T.M.S. 1980 A milk-born outbreak of *Campylobacter* infection. *Journal of Hygiene Cambridge* **84** 415-419.
- PORTMANN, A. & AUCLAIR, J.E. 1959 Relation entre la lacténine L₂ et la lactoperoxydase. *Lait* **39** 147-158.
- PRUITT, K.M., ADAMSON, M. & ARNOLD, R. 1979 Lactoperoxidase binding to Streptococci. *Infection and Immunity* **25** 304.
- PRUITT, K.M. & REITER, B. 1985 Biochemistry of peroxidase system antimicrobial effects. En: *The Lactoperoxidase System: chemistry and biological significance* (Editores: Pruitt, K.M. & Tenovuo, J.O.) Immunology Series vol **27** Marcel Dekker, New York.
- RAMOS, M. & JUAREZ, M. 1981 The composition of ewe's and goat's milk. *International Dairy Federation Document* **140** 19 pp.
- REITER, B. 1981 The contribution of milk to resistance to intestinal infection in the newborn. En: *Immunological Aspects of Infection in the Fetus and Newborn* (Editores: Lambert, H.P. & Wood, C.B.S.) Academic Press, London.

- REITER, B. 1985 The lactoperoxidase system of bovine milk. En: *The Lactoperoxidase System: chemistry and biological significance*. (Editores: Pruitt, K.M. & Tenovuo, J.O.) Immunology Series vol 27 Marcel Dekker, New York.
- REITER, B. & HÄRNULV, G. 1984 Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. *Journal of Food Protection* 47 724-732.
- REITER, B. & MARSHALL, V.M. 1979 Bactericidal activity of the lactoperoxidase system against psychrotrophic (pseudomonads) ssp. in raw milk. En: *Cold Tolerant Microbes in Spoilage and Environment* (Editores: Russel, A.D. & Fuller, R.) Society for Applied Bacteriology, Technical Series 13 Academic Press, London.
- REITER, B., MARSHALL, V.M., BJÖRCK, L. & ROSÉN, C.G. 1976 The non-specific bactericidal activity of the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system of milk against *E. coli* and some gram-negative pathogens. *Infection and Immunity* 13 800-807.
- REITER, B., MARSHALL, V.M. & PHILIPS, S.M. 1980 The antibiotic activity of the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system in the calf abomasum. *Research in Veterinary Science* 28 116-122.
- REITER, B., PICKERING, A. & ORAM, J.D. 1964 An inhibitory system-lactoperoxidase/thiocyanate/peroxide-in raw milk. En: *Proceedings International Symposium on Food Microbiology. Microbial inhibitors in food*. (Editor: Molin, N.) Almqvist and Wiksell, Uppsala.
- REITER, B., PICKERING, A., ORAM, J.D. & POPE, G.S. 1963 Peroxidase-thiocyanate inhibition of streptococci in raw milk. *Journal of General Microbiology* 33:xii.
- REITER, B., FULFORD, R.J., MARSHALL, V.M., YARROW, N., DUCKER, M.J. & KNUTSSON, M. 1981 An evaluation of the growth promoting effect of the lactoperoxidase system in newborn calves. *Animal Production* 32 297-306.
- REITER, C., SHARPE, M.E. & HIGGS, T.M. 1970 Experimental infection of the non-lactating bovine udder with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis*. *Research in Veterinary Science* 11 18.
- REMEUF, F., LENOIR, J. & DUBY, C. 1989 Étude des relations entre les caractéristiques physico-chimiques des laits de chèvre et leur aptitude à la coagulation par le presure. *Lait* 69 499-518.

- RICHARD, J. 1981 En: *Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity* Academic Press, London.
- ROBERTS, D. 1985 Microbiological aspects of goat's milk. A Public Health Laboratory Service survey. *Journal of Hygiene Cambridge* **94** 31-44.
- ROBINSON, D.A. & JONES, D.M. 1981 Milk-born *Campylobacter* infection. *British Medicine Journal* **282** 1374-1376.
- ROGINSKI, H., BROOME, M.C. & HICKEY, M.W. 1984a *Australian Journal of Dairy Technology* **39** 23 (Citado por Björck 1991).
- ROGINSKI, H., BROOME, M.C., HUNGERFORD, D. & HICKEY, M.W. 1984b *Australian Journal of Dairy Technology* **39** 28 (Citado por Björck 1991).
- ROTGANS, J. & HOOGENDOORN, H. 1979 The effect of brushing with a toothpaste containing amyloglucosidase and glucose oxidase on dental caries in rats. *Caries Research* **13** 150.
- RYAN, D.P. & GREENWOOD, P.L. 1990 Prevalence of udder bacteria in milk samples from four dairy goat herds. *Australian Veterinary Journal* **67** 362-363.
- SANDHOLM, M., ALI-VEHMAS, T., KAARTINEN, L. & JUNNILA, M. 1988 Glucose oxidase (GOD) as a source of hydrogen peroxide for the lactoperoxidase (LPO) system in milk: antibacterial effect of the GOD-LPO system against mastitis pathogens. *Journal of Veterinary Medicine* **35** 346-352.
- SCHIEMANN, D.A. 1979 Enrichment methods for recovery of *Y. enterocolitica* from foods and raw milk. En: *Contributions to Microbiology and Immunology, Y. enterocolitica: Biology, Epidemiology and Pathology*. (Editores: Carter, P.B., Lafleur, L. & Tome, S.) vol 5 Karger, Basel.
- SCHLECH, W.F., LAVIGNE, P.M., BORTOLUSSI, R.A., ALLEN, A.C., HALDANE, E.V., WORT, A.J., HIGHTOWER, A.W., JOHNSON, S.E., KING, S.H., NICHOLLS, E.S. & BROOME, C.V. 1983 Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine* **308** 203-206.
- SHANKER, S., ROSENFELD, J.A., DAVEY, G.R. & SORELL, T.C. 1982 *Campylobacter jejuni*: incidence in processed broilers and biotype distribution in human and broiler isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **43** 1219-1220.
- SHINDLER, J.S., CHILDS, R.E. & BARDSLEY, W.G. 1976 Peroxidase from human cervical mucus. *European Journal of Biochemistry* **65** 325-331.

- SIEVERS, G. 1979 The prosthetic group of milk lactoperoxidase is protoheme IX. *Biochimica et Biophysica Acta* **579** 181.
- SIRAGUSA, G.R. & JOHNSON, M.G. 1989 Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth by the lactoperoxidase-thiocyanate-H₂O₂ antimicrobial system. *Applied and Environmental Microbiology* **55** 2802-2805.
- SLOWEY, R.R., EIDELMAN, S. & KLEBANOFF, S.J. 1968 Antibacterial activity of the purified peroxidase from human parotid saliva. *Journal of Bacteriology* **96** 575.
- SOLER, A. 1989 Estudio de la calidad bacteriológica y química de la leche en Baleares. Tesis Doctoral. Universitat de les Illes Balears.
- SÖRBO, B.H. 1953 Crystalline rhodanase. I. Purification and physicochemical examination. *Acta Chemica Scandinavica* **7** 1129.
- STEEL, R.G. & TORRIE, J.H. 1980 Principles and procedures of statistics, a biometrical approach. (Editores: Napier, C. & Maisel, J.W.) McGraw-Hill International Book Co., Singapore.
- STEPHENS, S., HARKNESS, R.A. & COCKLE, S.M. 1979 Lactoperoxidase activity in guinea pig milk and saliva: correlation in milk of lactoperoxidase with bactericidal activity against *Escherichia coli*. *British Journal of Experimental Pathology* **60** 252-258.
- TAYLOR, D.N., PORTER, B.W. & WILLIAMS, C.A. 1982 *Campylobacter* enteritis: large outbreak traced to commercial milk. *Western Journal of Medicine* **147** 365-369.
- TENOVUO, J., MANSSON-RAHEMTULLA, B., PRUITT, K.M. & ARNOLD, R. 1981 Inhibition of dental plaque acid production by the salivary lactoperoxidase antimicrobial system. *Infection and Immunity* **34** 208-214.
- THAKAR, R.P. & DAVE, J.M. 1986 Application of the activated lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system in enhancing the keeping quality of raw buffalo milk at higher temperatures. *Milchwissenschaft* **41** 20-22.
- THEORELL, H. & ÅKESSON, A. 1943 *Arkiv Kemi. Mineral Geol.* 17B:7 (Citado por Paul & Ohlsson 1985).
- THEORELL, H. & PEDERSEN, K.O. 1944 En *The Svedberg* Almqvist & Wiksell, Uppsala (Citado por Paul & Ohlsson 1985).

- THOMAS, E.L. & AUNE, T.M. 1978 Lactoperoxidase, peroxide, thiocyanate antimicrobial system: correlation of sulfhydryl oxidation with antimicrobial action. *Infection and Immunity* **20** 456-463.
- THOMAS, E.L., PERA, K.A., SMITH, K.W. & CHWANG, A.K. 1983 Inhibition of *Streptococcus mutans* by the lactoperoxidase antimicrobial system. *Infection and Immunity* **39** 767-778.
- TIRARD-COLLET, P., ZEE, J.A., CARMICHAEL, L. & SIMARD, R.E. 1991 A study of the microbiological quality of goat milk in Quebec. *Journal of Food Protection* **54** 263-266.
- VALDEZ, G.F., BIBI, W. & BACHMANN, M.R. 1988 Antibacterial effect of the lactoperoxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide (LP) system on the activity of thermophilic starter culture. *Milchwissenschaft* **43** 350-352.
- VARO, J., LOPEZ, P., SANZ, B. & HERNANDEZ, P. 1977 Principales grupos microbianos de interés sanitario y tecnológico de la leche de cabra. *Anales de Bromatología* **29** 257-280.
- VIGNON, B. 1976 La fraction azotée non protéique du lait, importance, nature et variations. Thesis Département Science Université de Nancy, France.
- WALKER, S.J. & GILMOUR, A. 1986 The incidence of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacteria in goats milk in Northern Ireland. *Letters in Applied Microbiology* **3** 49-52.
- WHITE, W.E., PRUITT, K.M. & MÅNSSON-RAHEMTULLA, B. 1983 Lactoperoxidase-thiocyanate-peroxide antibacterial system does not damage DNA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **23** 267-272.
- WOOD, J.L. 1975 Biochemistry. En: *Chemistry and biochemistry of thiocyanic acid and its derivatives* (Editor: Newman, A.A.) Academic Press, London.
- WRAY, C. & MCLAREN, I. 1987 A note on the effect of the lactoperoxidase system on salmonellas *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Applied Bacteriology* **62** 115-118.
- WRIGHT, R.C. & TRAMER, J. 1958 Factors influencing the activity of cheese starters. The role of milk peroxidase. *Journal of Dairy Research* **25** 104-118.
- YOSHIDA, S. & YE-XIUYUN 1991 Isolation of lactoperoxidase and lactoferrins from bovine milk acid whey by carboxymethyl cation exchange chromatography. *Journal of Dairy Science* **74** 1439-1444.

- ZAJAC, M., BJÖRCK, L. & CLAEISSON, O. 1981 Antibacterial effect of the lactoperoxidase system against *Bacillus cereus*. *Milchwissenschaft* **36** 417-418.
- ZAJAC, M., GLADYS, J., SKARZYNSKA, M., HÄRNULV, G. & BJÖRCK, L. 1983a Changes in bacteriological quality of raw milk stabilized by activation of its lactoperoxidase system and stored at different temperatures. *Journal of Food Protection* **46** 1065-1068.
- ZAJAC, M., GLADYS, J., SKARZYNSKA, M., HÄRNULV, G. & EILERTSEN, K. 1983b Milk quality preservation by heat treatment or activation of the lactoperoxidase system in combination with refrigerated storage. *Milchwissenschaft* **38** 645-648.
- ZALL, R.R., CHEN, J.H. & DZUREC, D.J. 1983a Effect of thiocyanate-lactoperoxidase-hydrogen peroxide system and farm heat treatment on the manufacturing of Cottage cheese and Cheddar cheese. *Milchwissenschaft* **38** 203-206.
- ZALL, R.R., CHEN, J.H. & DZUREC, D.J. 1983b Effect of thiocyanate and hydrogen peroxide in cultured products. *Milchwissenschaft* **38** 264-266.