

**FACULTAD DE
AGRONOMIA
UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ACTIVACION DEL
SISTEMA LACTOPEROXIDASA EN LA MICROFLORA DE LA
LECHE CRUDA BOVINA, OVINA Y CAPRINA**

Por

Leticia Gricel PACKE MÁRQUEZ

TESIS presentada como uno
de los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo.

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2005**

Tesis aprobada por:

Directores:

Dra. Stella REGINENSI

Ing. Agr. Jorge BERMUDEZ

Ing. Agr. Andrés GANZABAL

Fecha:

Autor:

Leticia PACKE MÀRQUEZ.

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Stella Reginensi y al Ing. Agr., Jorge Bermudez por su permanente apoyo y dedicación.
- Al Ing. Agr. Andrés Ganzabal.
- Al productor Ricardo Posse y su familia.
- A la Sra. Teresa Tombolini por su colaboración durante el procesamiento de las muestras en el laboratorio.
- Al personal de transporte de la Facultad de Agronomía.
- A mi familia por su cariño, aliento e incondicional apoyo en todos estos años de estudio.
- A Daniel Pereira, por su incondicional apoyo.
- A todas aquellas personas que de una u otra forma me apoyaron y alentaron a llegar hasta aquí.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 ANTECEDNTES.....	2
2.2 EL SISTEMA LACTOPEROXIDASA (SLP).....	3
2.2.1 LOS COMPONENTES DEL SLP (Su origen y concentración en la leche cruda).....	4
2.2.1.1 Lactoperoxidasa (LP).....	4
2.2.1.2 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂).....	5
2.2.1.3 Tiocianato (SCN-).....	5
2.2.1.4 Antecedentes de la activación del SLP.....	7
2.2.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL SLP.....	8
3 EFECTO DE LA OBTENCION Y MANEJO DE LA LECHE, SOBRE LA CONTAMINACIÓN DE LA MISMA.....	10
3.1 FUENTE Y TIPO DE CONTAMINACION EN LA LECHE CRUDA.....	11
3.1.1 Interior de la ubre.....	11
3.1.2 Exterior de la ubre.....	11
3.1.3 Equipo de ordeño y tanque de frío.....	12
3.2 INFLUENCIA DE LA ESTACION DEL AÑO EN LA MICROFLORA DE LA LECHE, Y SU EFECTO EN EL DETERIORO DE LA MISMA.....	12
3.3 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN Y TRATAMIENTO EN LA PROLIFERACIÓN DE LAS BACTERIAS EN LA LECHE.....	15
3.3.1 Efecto cuantitativo.....	15
3.3.2 Efecto cualitativo.....	15
3.4 CALIDAD DE LA LECHE.....	16
3.4.1 Microflora psicrotrofa (su importancia en la conservación de la leche).....	17
4 OBJETIVOS.....	18
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	18
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	18
5 MATERIALES Y METODOS.....	19
5.1 MUESTREO.....	19
5.1.1 Toma de muestras.....	19
5.1.2 Medición del tiocianato.....	19
5.1.3 Determinación del tiocianato en la leche.....	20
5.2 ACTIVACION DEL SISTEMA LACTOPEROXIDASA.....	20

5.2.1 Concentración de los reactivos.....	21
5.2.2 Aplicación del producto.....	21
5.3 RECuento MICROBIOLÓGICO.....	21
5.3.1 Recuento de diferentes grupos bacterianos.....	21
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
7 CONCLUSIONES.....	34
8 RESUMEN.....	36
9 BIBLIOGRAFÍA.....	37

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro N°	Página
1. Concentración de tiocianato en leche cruda bovina, ovina y caprina, según distintos autores.....	6
2. Actividad antibacteriana del SLP contra varias bacterias.....	10
3. Porcentaje de distintos grupos bacterianos, en distintos puntos del proceso de obtención de la leche bovina en dos épocas del año.....	14

Figura N°

1. Porcentaje de disminución de los recuentos microbianos en leche cruda bovina según época del año, tratamiento y grupo de bacterias.....	22
2. Evolución del contenido de tiocianato en leche cruda bovina según tratamiento y época del año.....	24
3. Porcentaje de disminución de los recuentos microbianos en leche cruda caprina según época del año, tratamiento y grupo de bacterias.....	25
4. Evolución del contenido de tiocianato en leche cruda caprina según tratamiento y época del año.....	26
5. Evolución del contenido de tiocianato en leche cruda ovina según tratamiento y época del año.....	27
6. Porcentaje de disminución de los recuentos microbianos en leche cruda ovina según época del año, tratamiento y grupo de bacterias.....	28
7. Evolución de los mesófilos totales viables en las tres especies, según momento del muestreo.....	29
8. Evolución de la microflora psicrófila viable en las tres especies, según momento del muestreo.....	30
9. Recuento de bacterias (mesófilos totales, enterobacterias y psicrófilos), en leche cruda bovina, en los tres momentos evaluados.....	31
10. Evolución de las enterobacterias en las tres especies, según momento del muestreo.	32
11. Evolución de los estafilococos en las tres especies, según momento del muestreo.	33

1. INTRODUCCIÓN

El control del deterioro de la leche por microorganismos, durante el período previo a la industrialización afecta en forma importante las características de calidad de la materia prima, y sus consecuencias pueden ser medidas en el rendimiento quesero, la presencia de sabores indeseables y la inconsistencia (duración, estabilidad, solidez) del producto.

Estos microorganismos pueden ser controlados por diferentes métodos, y uno de ellos es activando el sistema inhibitorio natural (Lactoperoxidasa) presente en la leche cruda. Los estudios sobre el tema comenzaron en Cuba en el año 1972. El principio de activación del sistema fue aprobado y recomendado en el XX Período de Sesiones por la Comisión del CODEX ALIMENTARIUS FAO-OMS desde 1991.

Los trabajos desarrollados en la Unidad de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Agronomía, en relación a la calidad microbiológica de la leche bovina, caprina y ovina señalan los importantes efectos en las subfracciones caseínicas sobre las diferentes leches estudiadas bajo condiciones de conservación en frío. Estos aspectos pueden ser diferentes de acuerdo a la especie productora de la leche, puesto que en bovinos es rutinaria la recolección cada dos días, mientras que en ovinos y caprinos se realiza dos veces por semana, lo cual refleja la importancia de métodos de conservación en las diferentes especies.

Por lo antedicho, uno de los posibles impactos de la activación del Sistema Lactoperoxidasa (SLP) es la posibilidad de mantener la leche en el tambo por más días sin ser recogida, sin que los recuentos de microorganismos aumenten en forma importante, y deterioren la misma. Esto implicaría una materia prima para la industria de mejor calidad, lo cual permite una selección mas exhausta para la fabricación de lácteos de excelente calidad o para productos que requieren mucho tiempo de almacenamiento.

En este trabajo se pretende conocer la variación del SLP en leche de cabra, vaca y oveja en distintos momentos del año, lo cual nos permitiría contar con una herramienta útil para poder tomar decisiones en cuanto a la activación del mismo.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 Antecedentes

En 1967, el Cuadro FAO/OMS de expertos en la calidad de la leche llegó a la conclusión de que el empleo de peróxido de hidrogeno tal vez fuera una alternativa aceptable en las primeras fases de una industria lechera organizada, siempre y cuando se cumplieran ciertas condiciones. No obstante, este método no obtuvo satisfacción general, dado que presenta varias desventajas: difícil dosificación en pequeños volúmenes, irritante a la piel, inestable a la luz y al calor, efecto oxidativo sobre la grasa, reacción con proteínas, necesidad de utilizar catalasa para destruir remanentes, reacciona sobre superficies metálicas, interfiere en algunos métodos analíticos como el de las proteínas, en ocasiones se utiliza para ocultar la calidad inferior de la leche producida en condiciones de higiene deficientes, además de que se plantearon los aspectos toxicológicos que implicaba el uso de concentraciones relativamente elevadas de peróxido de hidrógeno en la leche. (FAO/OMS 2000; Ponce, 2002)

Uno de los sistemas mas estudiados en los últimos 20 años es el sistema lactoperoxidasa – tiocianato – peróxido de hidrogeno, debido a sus posibilidades potenciales para evitar el deterioro de la leche cruda frente al desarrollo de microorganismos indeseables (Ponce, 2002). La aplicación mas ampliamente recomendada de este sistema en el procesamiento de los alimentos, ha sido en la industria láctea, para la preservación de la leche cruda durante su transporte a las plantas procesadoras (Ozdemir et al. 2001). La adición de pequeñas cantidades de tiocianato y peróxido (líquido o en forma de percarbonato) mejora la acción del sistema.

Este constituye un mecanismo de defensa natural del organismo humano, y sus componentes aparecen en altas concentraciones en la saliva, jugo gástrico, y en la propia glándula mamaria, por lo cual se considera que su activación no representa ningún riesgo para las personas que consumen la leche tratada (FAO/OMS, 1991; Björck, 1991).

La FAO, con el apoyo del gobierno de Suecia, supervisó demostraciones del sistema de la lactoperoxidasa (SLP) para la conservación de la leche en unos 80 países. (FAO/ONU, 2000)

2.2 El sistema Lactoperoxidasa (SLP)

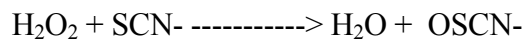
La leche contiene varios factores antibacterianos, entre ellos los más conocidos son las inmunoglobulinas. También contiene otros factores no específicos, como la lisozima, la lactoferrina y la peroxidasa.

Las peroxidases son de las enzimas que forman parte de los sistemas de defensa naturales. En leche dicha enzima recibe el nombre de lactoperoxidasa y es idéntica a la presente en la saliva; lágrimas y las secreciones gástricas (FAO/ONU, 2000). Estos sistemas de protección cumplen un rol de defensa contra la invasión de las mucosas por las bacterias. Las lactoperoxidasas no tienen actividad antibacteriana por sí mismas, pero en presencia de cofactores determinados, ellas constituyen un poderoso sistema de defensa. Estos cofactores son, por un lado el H_2O_2 y por otra parte un ión, de acuerdo a la especificidad de la enzima, siendo estos, el ión SCN^- (tiocianato), Cl^- , Br^- y I^- . (Perraudin, 1991)

Fue en 1924 que Hanssen estableció una correlación entre la actividad bactericida de la leche cruda contra *Bacillus thymophora* y *Bacillus paratyphora*, y la actividad de las peroxidasa y oxidasas presentes en la leche. Wright y Tramer (1958), estudiando un grupo de estreptococos, llegaron a la misma conclusión. Dichos autores igualmente sugirieron que la inhibición de los gérmenes era debido a un agente oxidativo formado por la acción de la peroxidasa, en presencia de peróxido de hidrógeno, producido por los estreptococos bajo condiciones aerobias.

El SLP presente en la leche cruda, es un sistema enzimático, compuesto por la enzima lactoperoxidasa, y sus dos substratos (el H_2O_2 y el ion tiocianato), donde el producto de la reacción, el anión hipotiocianato es bactericida a concentraciones de micromoles/L. Aune y Thomas (1977) por un lado y Hoogendoorn y sus colaboradores por otro, llegaron a la misma conclusión; que el (hipotiocianato) $OSCN^-$ era el agente antibacteriano del sistema. (Perraudin J.1991)

La reacción de oxidación se puede resumir de la siguiente manera:



El producto de la reacción, el hipotiocianato, es un agente oxidante, con una corta duración de vida, que va a reaccionar, por ejemplo con los grupos NH_2 o $-SH$ de las enzimas esenciales del metabolismo bacteriano. (J. Perraudin et al, 1991) Este compuesto es considerado el mayor inhibidor a pH fisiológico. Otros productos, con actividad antibacterial, son formados en esta reacción, tales como el ácido cianosulfuroso (HO_2SCN), y el ácido cianosulfúrico (HO_3SCN) (Aune y Thomas, 1977; Björck et al., 1979), capaces también de oxidar los grupos sulfhídricos de las proteínas de las bacterias (Aune y Thomas, 1977; Reiter y Härnultv, 1984; Thomas, 1981.)

El efecto antibacteriano es proporcional a la formación de los productos de la oxidación del tiocianato. (BJÖRCK et al 1975, FAO/ONU, 2000) Ésta a su vez depende

de las concentraciones disponibles de tiocianato y peróxido de hidrógeno en la leche. (FAO/ONU, 2000) Björck et al, en 1975, observó que la disminución en el número de bacterias seguía la disminución en el tiocianato, y en la leche las bacterias remanentes comenzaban a multiplicarse cuando el tiocianato se agotaba.

El SLP es activado cuando la concentración de SCN esta entre 10 y 15 mg/L y la de H₂O₂ esta entre 8 y 10 mg/L (Mee, 1994; Medina et al., 1989; Santos et al., 1994; Zapico et al., 1991).

Según Althaus et al; 2001, el conocimiento de los cambios en las concentraciones de SCN- y H₂O₂ a través del ciclo de la lactancia, determinan las cantidades adicionales aproximadas para activar el SLP.

2.2.1 Los componentes del SLP (Su origen y concentración en la leche cruda).

2.2.1.1 Lactoperoxidasa:

Este es el nombre que se le da a la peroxidasa de la leche. La misma se encuentra naturalmente, en concentraciones suficientes para activar el SLP. En el calostro bovino, el contenido es muy bajo, pero aumenta rápidamente 4 o 5 días posparto (Losnedahl et al 1996). Según (Björck et al 1975), luego de esto hay una declinación gradual en su concentración, mientras tanto otros autores, señalan que su concentración se mantiene prácticamente constante durante toda la lactación, siendo la misma de aproximadamente 30 mg/L, según (FAO/ONU, 2000, Losnedahl, 1996 y Björck et al 1975), y en un rango de 10 a 30 mg/L según (Piard et al, 1991), siendo la cantidad necesaria para la actividad antibacteriana de apenas 1 mg/L, según (FAO/ONU, 2000). Pruitt y Reiter en 1985 demostraron que las reacciones del SLP podrían ser catalizadas por una concentración de la enzima tan baja como 0.5 ng/L.

Zapico et al en el año 1991, realizó un estudio en cabras de las razas españolas Verata y Murciano Granadina, relacionando la influencia de la raza, del animal y de los días del ciclo de lactación en la LP y el SCN. Los mismos llegaron a la conclusión de que la LP de la leche de cabra tiene un comportamiento distinto al encontrado en leche de vaca. El contenido de lactoperoxidasa en la leche a través de la lactación promedio 0,95 U/ml en la raza Verata y 2,15 U/mL en la raza Murciano-Granadina. Por lo cual, la concentración de LP encontrada en el presente trabajo para leche de cabra (1,55 U/mL) fue superior a los niveles encontrados previamente en leche para vaca (1,4 U/mL), búfalo (0,9 U/mL), y oveja. El contenido de LP promedio en leche de oveja es de 0,77 U/mL y esta dentro de un rango de 0,14 a 2,38 U/mL para los individuos (Medina et al, 1989, citado por Zapico et al, 1991). Los resultados indican diferencias significativas (P<.001) entre las razas luego del análisis de la varianza. Los días de lactación también exhibieron un muy alto (P<.001) efecto significativo sobre la concentración de la LP en leche de cabra. En dicho trabajo, las concentraciones más bajas fueron encontradas las primeras 24 horas luego del parto,

siendo 0.3 U/mL para Verata y 0.20 U/mL para Murciano-Granadina. Estos valores difirieron significativamente ($P < .001$) de los registrados en cualquier otro estado de lactación. La LP en la leche de cabra muestra un patrón diferente al de la leche de vaca. Su concentración en la leche de cabras Verata aumenta desde 0,03 U/mL durante las primeras 24 horas hasta un rango de 0,59 a 1,0 U/mL durante los tres primeros meses de lactación, con la única excepción, siendo 1,23 U/mL en el día 7. Niveles superiores (1,44 a 1,46 U/mL) fueron detectados al final de la lactación (135 a 150 días).

2.2.1.2 Peróxido de hidrogeno:

El peróxido de hidrógeno normalmente no se detecta en forma natural en la leche sin bacterias (Björck et al 1975, Piard et al, 1991), sin embargo se han encontrado trazas en la leche recién ordeñada, posiblemente procedentes del metabolismo del tejido mamario y los leucocitos polimorfos nucleares. Otra fuente es a partir de la reacción de la xantina oxidasa con algún sustrato, por ejemplo la hipoxantina (FAO/ONU, 2000, Perraudin, 1991). En la leche ordeñada, el peróxido es producido por las bacterias ácido lácticas en condiciones aerobias; incluso cuando la leche es almacenada a bajas temperaturas (Piard et al, 1991). Price y Lee en 1970, (citado por Piard, 1991) concluyeron que el peróxido producido por *Lactobacillus* inhibía a *Staphylococcus aureus*, y la producción óptima del H_2O_2 se obtenía a 5°C. (Björck L. et al 1975).

El peróxido, así como se forma, parece ser rápidamente reducido por la catalasa o la peroxidasa. (J. Perraudin, 1991), debido a esto es que el H_2O_2 se presenta en muy pequeñas cantidades (Björck et al., 1975). Generalmente su concentración en la leche es muy baja (Losnedahl, 1996).

2.2.1.3 Tiocianato:

El anión SCN^- esta ampliamente distribuido en las secreciones animales y en los tejidos, y sus concentraciones dependen en gran parte de los hábitos alimenticios del animal y hábitos de vida de los individuos. (Piard et al, 1991, FAO/ONU, 2000, Björck L. et al 1975 y FAO/OMS, 2000) De acuerdo a Virtanen (1963), el mismo se deriva de la hidrólisis enzimática de los glucósidos en *brassicaceae* y *raphani* y detoxificación del cianuro. Por otra parte parece que los valores de SCN^- en la leche son influenciados por el estado sanitario de la ubre. Cuando ésta presenta signos aparentes de infección, la leche contiene más SCN^- . Contiene en esos casos más de 5×10^5 leucocitos/ml pareciendo luego que el incremento de SCN^- proviene del plasma (Perraudin, 1991).

Boulangè en 1963, demostró la fluctuación estacional de los valores de tiocianato con un mínimo en invierno y máximo en verano. El origen alimenticio de esta fluctuación fue demostrado precedentemente por el mismo autor en 1959. También se señaló a la leche de cabra como la más rica en dicho compuesto, conteniendo esta, 4 veces más que la leche de vaca (Perraudin, 1991).

Según Althaus et al, en el año 2001, en un estudio realizado con ovejas de la raza Manchega, llegaron a la conclusión de que el momento en que se hace el análisis de los componentes del SLP, afecta su concentración. Dicha concentración fue más elevada cuando las muestras fueron analizadas a las 6 horas del muestreo, que cuando fueron analizadas a las 12, 24 y 48 horas del mismo. La caída en la concentración de SCN observada en los diferentes análisis puede ser atribuida a la continua transformación de este en ion hipotiocianato. En forma similar, Martínez et al. (1988), en su estudio de la acción inhibitoria del SLP activado en leche de vaca durante su almacenamiento a 4°C, reportaron una disminución de 1,4 mg/L en la concentración de SCN, en un período de 48 hs inmediatas al muestreo. Gaya et al, (1991) reportaron que una menor actividad en la LP estaba ligada a un aumento en el número de microorganismos de *L. monocytogenes* de un valor en base logaritmo de 5,50 a las 8 horas a 6,32 a las 48 horas, lo cual demuestra la disminución de la capacidad de este sistema debido a las continuas disminuciones en la concentración de estos componentes.

En cuanto a los valores de SCN- encontrados en leche, los mismos son variables, de acuerdo a la fuente. En el Cuadro 1, se presentan los valores de tiocianato, según los distintos autores, para bovinos, ovinos y caprinos.

Cuadro 1: Concentración de tiocianato en leche cruda bovina, ovina y caprina, según distintos autores. (Cuadro realizado por recopilación de resultados)

FUENTE/ESPECIE	[SCN] (#)	Expresado en mg/L (*)	Comentarios
Björck, 1975, Bovina	0,017 - 0,26 mmol	0,987 - 15,09	
Reiter, B., 1985 Bovina	15 ppm	15,47	(1)
Perraudin et al, 1991, Bovina	0,1 - 10 ppm (15 en Verano)	0,103 - 10,31 (15,47)	(2)
Haddadin et al, 1996, Bovina	15 mg/L	15	(3)
FAO, 2000, Bovina	4,5 ppm	4,64	(4)
Ponce et al 1992, Bovina	0,108 - 0,144 mmol/L	6,27 - 8,36	
Wood, 1975, Bovina	1 - 10 ppm	1,03 - 10,31	
Björck, et al, 1979, Bovina	3,2 - 4,6 ppm	3,3 - 4,74	
Härnultv et al, 1982, Bovina	1,6 - 7 ppm	1,65 - 7,22	
Haddadin et al, 1996, Ovina	0,4 mg/L	0,4	
Medina et al, 1989, Ovina	10,3 ppm	10,67	
Althaus et al, 2001, Ov Manch.	6,89 mg/L	6,89	(5)
Zapico et al, 1991, Caprina V y M.G	5,76 y 3,2 ppm resp.	5,94 y 3,3	(6)

(#) Concentración de tiocianato expresada tal cual el autor.

(*) Concentración de tiocianato en mg/litro, considerando las densidades promedio de leche bovina, ovina y caprina: 1.0315 gr./cm³, 1.036 gr./cm³ y 1.0324 gr./cm³, respectivamente.

mmol/l de SCN = mg/l de SCN/58,07 (Ponce et al, 1992)

(1) Reiter en 1985, encontró niveles de SCN⁻ en leche de 15 ppm y superiores. En este caso los animales habían sido alimentados en pasturas naturales que contenían trébol.

(2) El autor menciona que la concentración de este compuesto depende del régimen alimenticio de los animales, del consumo de trébol, por ejemplo, o de crucíferas (las cuales pueden elevar los contenidos en la leche).

(3) Al igual que Reiter (1), Haddadin et al, en 1996 coinciden en los valores de SCN⁻ hallados en leche bovina, y mencionan que la misma es suficiente para sostener un efecto antimicrobiano.

(4) En el manual sobre el uso de la lactoperoxidasa publicado por la FAO en el año 2000, se menciona que el contenido habitual de este compuesto es de alrededor de 4.5 ppm

(5) Este fue el valor promedio que encontraron los autores, durante el ciclo de la lactancia en su estudio con ovejas Manchega. Las variaciones en la concentración de SCN⁻ a lo largo del ciclo no fueron suficientes para activar el SLP. Althaus et al, en el año 2001 llegan a la conclusión de que adicionando 5 mg/L de SCN⁻ y 8 mg/L de H₂O₂, el SLP puede ser activado en cualquier momento de la lactancia.

(6) Zapico et al, 1991, menciona que la concentración mas baja de tiocianato en la leche de cabra que en la de oveja se debe probablemente al tipo de alimentación. Dichos autores llevaron a cabo su investigación con cabras de las razas españolas, Verata (V) y Murciano Granadina (M.G), las cuales habían sido alimentadas con pasturas naturales.

La combinación de los tres componentes proporciona el mecanismo de las propiedades bacteriostáticas de la leche recién ordeñada, que duran hasta dos horas, mientras el lactante consume la leche directamente de la madre. Si se mantiene la leche en un recipiente a la sombra, a unos 30 °C, dura de 6 a 8 horas. Si se mantiene a 15 – 20 °C dura 12 horas sin alteración de la leche (FAO/ONU, 2000).

2.2.1.4 Antecedentes en la activación del SLP

Haddadin et al, 1996 en su estudio, evaluaron la habilidad del SLP para prolongar la vida útil de la leche de cabra y oveja a temperatura ambiente y de refrigeración. Además incluyeron el comportamiento de la leche de vaca, con los mismos niveles de reactivos, con el propósito de poder compararlas. Los resultados demostraron que, mediante la activación del sistema en leche cruda, es posible almacenar la leche a 4 °C por varios días. Altas concentraciones de NaSCN-/H₂O₂ fueron solo marginalmente más efectivos que los mínimos niveles evaluados, y por esto un nivel de iones de tiocianato de 15 mg/l en leche pueden ser suficientes para retardar el riesgo de descomposición por microorganismos previo al procesamiento; a este nivel debería ser insignificante.

A temperaturas de almacenaje superiores, la mayor ventaja se observo con la leche de vaca, y cualquier incremento serio en la acidez fue inhibido por aproximadamente 18 horas.

Con las leches de cabra y de oveja, los elevados conteos iniciales de células somáticas de las muestras testadas tendieron a anular el efecto conservante del sistema a temperatura ambiente, pero aún así, el desarrollo de la acidez fue suprimida por varias horas, en relación a las muestras control; 4 °C y los autores concluyen que una relación 15/10 (SCN-/H₂O₂), son recomendadas en las leches crudas de oveja y cabra para mantener la calidad.

Por su parte, Laemmli, (1970), sostiene que si el SLP es activado inmediatamente antes de la aplicación de procesos térmicos, la vida útil de los productos lácteos pueden ser extendidos en forma significativa, y los procesos con elevadas temperaturas pueden ser sustituidos con tratamientos de temperaturas mas bajas y económicas. Además del ahorro de energía, los procesos térmicos con bajas temperaturas, pueden proveer una mejor retención del valor de los nutrientes y calidad de los alimentos.

Ponce et al (1992), en su estudio sobre la conservación de la leche en Cuba mediante la activación del sistema Lactoperoxidasa, concluyó que la dosificación del tiocianato a partir del conocimiento de su concentración en la leche (mezclas) permitió determinar un valor mínimo para la activación del SLP, y un valor máximo que no rebasa el límite establecido en estudios anteriores, y que concuerda con los valores normales relativos a las vacas lecheras. Además la concentración de SCN adicionado (8.6 mg/L) es prácticamente la mitad de la que se recomienda en el CODEX ALIMENTARIUS (14 mg/L de leche). Los ensayos realizados por Ponce et al, permitieron comprobar también, la eficacia del SLP tanto en leche de tambo, como en leche proveniente de diferentes itinerarios de recolección, así como también de leches almacenadas en silos industriales.

La biopreservación de la leche cruda por la activación del SLP, inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos y mejora la seguridad de los alimentos. Seifu et al (2004), realizaron estudios donde evaluaron el efecto del SLP sobre *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* y *Brucella melitensis* en leche caprina. Los resultados indican disminución de la carga de la microflora actuante en leche cruda sin la activación del SLP.

2.2.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL SLP

El mayor efecto de estos metabolitos, sobre los microorganismos se produce cuando se oxida el tiocianato y ocurre a nivel de los grupos sulfhidrilo de enzimas metabólicas. Debido a esto las hexoquinasas son totalmente inhibidas y las aldolasas y las 6- fosfogluconato deshidrogenasa son parcialmente inactivadas por el sistema LP.

El SLP también causa lesiones en la membrana citoplasmática, causando pérdida de iones K, aminoácidos y polipéptidos de las células. Los sistemas transportadores de azúcares y de aminoácidos también son inhibidos, y por lo tanto la síntesis de ADN, ARN

y proteínas. (Piard et al, 1991) A consecuencia de todo esto el metabolismo bacteriano es inhibido, como su capacidad de división celular. (FAO/OMS, 2000)

El SLP tiene un amplio espectro de actividad, incluyendo la mayoría de las bacterias G- encontradas en la leche, como por ejemplo *Pseudomonas* y *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella*. Pruitt y Reiter (1985) publicaron una lista de los efectos biológicos causados por el SLP en las bacterias (ver Cuadro 2). Entre las especies de G+ indeseables los autores demostraron que el SLP retrasa el desarrollo de *L monocytogenes*. (Piard et al, 1991).

Según el CODEX ALIMENTARIUS, 2000 el efecto antibacteriano depende de la especie y la cepa. Cuando la leche cruda tiene una flora mixta en la que predominan las bacterias mesófilas, el efecto es bacteriostático. En presencia de algunas bacterias G-, por ejemplo, *Pseudomonas* o *Escherichia coli*, el efecto es bactericida. Dado el efecto principalmente bacteriostático del sistema, la aplicación de este método no permite ocultar la calidad inferior de la leche cuando ésta se halla contaminada ya por numerosos géneros bacterianos.

Björck, en 1975, también señalaba que los productos de la oxidación del tiocianato inhibían las bacterias G+, y eran bactericidas para bacterias G- como las especies citadas previamente. Según Zapico et al, (1991) han sido publicados informes sobre la actividad antibacterial contra *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus uberis*, y *Bacillus cereus*.

Cuadro 2: Actividad antibacterial del SLP contra varias bacterias.

	Actividad biológica	
	Bacteriostática	Bactericida
<u>Bacterias ácido lácticas</u>		
<i>Lactococcus sp.</i>	*	
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	*	
<u>Bacterias de deterioro</u>		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		*
<i>Bacterias G-</i>		*
<i>Bacillus cereus</i>	*	
<u>Bacterias patógenicas</u>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		*
<i>Escherichia coli</i>		*
<i>Salmonella sp.</i>		*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		*
<i>Listeria monocytogenes</i>	*	

(Pruitt y Reiter, 1985).

3. EFECTO DE LA OBTENCION Y MANEJO DE LA LECHE SOBRE LA CONTAMINACION DE LA MISMA.

Según Cottier (1991), el hecho de que para obtener una misma cantidad de leche con ovejas que con vacas, es necesario ordeñar de 10 a 15 veces más animales, hace que los riesgos de contaminación por los pezones se vean sensiblemente incrementados. Además algunas prácticas aplicables para el ordeño de vacas (lavado previo de la ubre) son imposibles de realizar con estos animales. Únicamente por esta razón es más difícil obtener una buena calidad bacteriológica en la leche de oveja que en la de vaca.

El número y le tipo de microorganismo presentes en la leche recién ordeñada, refleja directamente la contaminación microbiana durante su obtención. La microflora de la leche cuando abandona la granja depende de la microflora inicial, del tiempo transcurrido hasta alcanzar la temperatura de conservación, de la temperatura a la que se ha almacenado y del tiempo transcurrido hasta la recolección. Por lo que para obtener leche de buena calidad microbiológica es necesaria una buena higiene durante el ordeño, un rápido enfriamiento y buenas condiciones durante el almacenaje en el tanque. También es necesario mantener la temperatura en el rango óptimo para una adecuada conservación durante el transporte de la leche desde el tambo hasta la planta procesadora. Cuando la leche se enfría y se mantiene a una temperatura menor o igual a 4°C, se previene

normalmente la multiplicación de las bacterias al menos en las primeras 24 horas y la microflora es similar a la presente tras el ordeño (Cousin y Bramley, 1987)

La importancia de la microflora presente en la leche no solo va a determinar el estado higiénico y sanitario del tambo sino también la calidad de la leche en relación al grado de deterioro de la misma por la cantidad de enzimas liberadas por microorganismos o células somáticas (aumentado en caso de mastitis).

En leche ovina el crecimiento microbiano es retardado debido a una alta actividad inmunológica y un alto poder buffer Alichanidis y Polichroniadou, (1996). Dicha leche presenta una resistencia al desarrollo de bacterias durante las primeras horas debido a la actividad inmunológica, y un mayor contenido de minerales (el doble) con respecto a la leche de vaca lo cual le da un mayor poder tampón Assenat, (1991).

3.1 FUENTE Y TIPO DE CONTAMINACION EN LA LECHE CRUDA.

La leche es sintetizada en la glándula mamaria y es virtualmente estéril al ser secretada. La contaminación puede ocurrir de tres fuentes:

3.1.1 interior de la ubre (normal < 1000 UFC/ml)

Mastitis: cepa infectante (*S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. aureus*)

Una vaca puede aportar 10^7 bacterias/ml

La leche es ordeñada a partir de un animal sano, casi siempre contiene gérmenes inocuos, que contaminan la leche en el momento de su obtención. Los gérmenes que predominan son saprofitas pertenecientes principalmente a los géneros *Corynebacterium* y *Micrococcus*. También existen gérmenes patógenos dentro de los cuales se ubican: *Streptococcus* y *Staphylococcus* hemolíticos, pero en ocasiones pueden intervenir otras numerosas especies. Dicho autor señala también que las leches de cabra y oveja son más frecuentemente estériles a la salida de la mama que la leche de vaca.

Este tipo de microorganismos influyen en el conteo en tanque de frío. (Alais, 1985)

3.1.2 exterior de la ubre: una vaca puede aportar 10^8 a 10^{10} bacterias/ml *Enterobacterias*, *termodúricos* y *psicrotrofos*, éstos influyen en los conteos postpasteurización.

Este tipo de contaminación suele ser cuantitativamente más importante en relación a la anterior; su importancia es extremadamente variable según las condiciones de producción y conservación de la leche.

El exterior de los pezones es una fuente de contaminación frecuente y aporta gérmenes y esporas. Sobre todo gérmenes psicrotrofos y microorganismos termoresistentes (Caraballo y Douglas, 2002). Según Cousin (1982), en el suelo y la vegetación hay una gran cantidad de psicrotrofos, los cuales para nuestras condiciones de producción son una fuente importante de contaminación de las ubres junto con la materia fecal, e intervienen en el deterioro enzimático de la leche, afectando la calidad de la misma desde la utilización del tanque de frío.

3.1.3 equipo de ordeño y tanque de frío: La máquina de ordeño, es la fuente de contaminación más importante. El nivel de incidencia de esta fuente de contaminación va a depender del estado de la maquina en general y del grado de limpieza alcanzado. Cousin (1982), concluyó que el equipo de ordeño es el causante de la mayor contaminación microbiana en los tambos que almacenan la leche en tanque de frío. Este, estudio la incidencia de la flora bacteriana en tanque de frío y encontró una alta cantidad de bacterias Gram negativas, especialmente en aquellos tanques que estaban mal lavados y desinfectados. Las especies *Streptococcus*, *Micrococcus* y *Corynebacterium* fueron encontradas en pequeñas cantidades y los bacilos esporiformes constituían alrededor del 10 % de la población total.

También es muy importante señalar el problema que existe por la presencia de los “biofilm” en los equipos de ordeño y en el tanque de frío, indicadores de las malas prácticas higiénicas y sanitarias realizadas en los tambos, fuentes de recontaminación de la leche.

3.2 INFLUENCIA DE LA ESTACIÓN DEL AÑO EN LA MICROFLORA DE LA LECHE Y SU EFECTO EN EL DETERIORO DE LA MISMA

Los resultados encontrados en la bibliografía indican que la composición de la flora microbiana presente en la leche puede variar a lo largo del año. Suhren, en 1989, observó que los conteos totales en invierno y en verano eran similares, pero los conteos de psicrótrofos en invierno fueron considerablemente mayores que los de verano, a pesar de que la temperatura del tanque de frío fue mas baja en invierno.

Según Tirard-Collet et al, 1991, en un trabajo realizado en Canadá, donde se estudio la calidad microbiológica en leche de cabra en 6 tambos, se vio que los conteos totales de microorganismos aeróbicos fueron más altos durante los meses de mayo a octubre (Primavera – Verano) y en el mes de julio (Principio de verano) los conteos totales de microorganismos aeróbicos presentaron un promedio de $6,4 \times 10^5$ UFC/mL. Este incremento puede ser debido a una mayor temperatura ambiental durante el ordeño en los meses de verano.

Según Anifantakis 1993, los conteos de mesófilos totales viables, *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Streptococcus*, fueron significativamente mayores durante los meses de mayo, junio y julio (Primavera), mientras que los coliformes y los microorganismos aeróbicos formadores de esporas presentaron niveles mayores durante los meses de marzo y abril (Invierno – Primavera) (estos datos fueron obtenidos del hemisferio norte).

En Uruguay los estudios realizados en leche bovina en diferentes estaciones del año indican un predominio de psicrotrofos desde abril a octubre y en los meses de junio y julio presentaron un mayor porcentaje del género *Pseudomonas*. En los meses de verano

predomina el género termodúrico *Microbacterium* sin incidencia en el deterioro de la leche (Bermúdez et al., 2000). Según Hull et al. (1992) el género *Microbacterium* no tiene capacidad para deteriorar la leche por no tener efectos proteolíticos ni lipolíticos. Sin embargo, su importancia radica en sus condiciones de especie termodúrica con 100 % de supervivencia respecto a otras especies termodúricas. Normalmente no se multiplican en forma apreciable en la leche cruda, aun a temperatura ambiente, por lo cual su presencia responde a la mala higiene de los equipos utilizados en el ordeño.

Con respecto a la leche ovina y caprina, Caraballo y Douglas, (2002), en su evaluación del deterioro proteico por psicrotrofos en leche ovina y caprina (Uruguay), llegaron a las siguientes conclusiones:

*Durante el período de lactancia en ambos tipos de leche el recuento de mesófilos aerobios, fue máximo en el mes de enero, al 4^{to} día de almacenaje en tanque de frío, lo cual podría estar asociado a una mayor temperatura ambiental durante el ordeño y también una mayor oscilación de la temperatura de la leche en el tanque debido a un aumento en el tiempo necesario para alcanzar la temperatura óptima de refrigeración (4 °C)

*La composición de la flora microbiana presente en ambos tipos de leche no fue homogénea a lo largo de la lactancia. Para leche caprina, en los meses de octubre a noviembre, a las 96 horas en el tanque de frío, las especies predominantes fueron *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas fragi* (45%), *Enterobacter aerogenes* (10%) y *Acinetobacter* (15%) con alta actividad proteolítica. El nivel de psicrotrofos fue mayor en diciembre que en noviembre, sin embargo las especies predominantes en este período no producen deterioro proteolítico a los tres días de almacenaje.

Para leche ovina, en los meses de octubre a noviembre, las especies predominantes fueron *Pseudomonas* (35%) y *Enterobacter* (10%) con menor conteo de psicrotrofos en tanque de frío. La actividad proteolítica detectada en esta leche es menor a la presentada en leche caprina.

*En cuanto a la actividad proteolítica desarrollada por mesófilos aerobios, se detecta solo en el mes de enero en leche de cabra, mientras que en la leche de oveja no se evidencio. Esto último, según los autores, puede ser explicado por los géneros predominantes en ambas especies y también debido a la mayor actividad inhibitoria natural de la leche ovina.

*Los recuentos de mesófilos aerobios al 4to día de almacenaje durante el período de lactancia estuvieron en leche caprina entre $4,2 \times 10^6$ y $5,9 \times 10^6$ UFC/mL, y para leche ovina, los valores estuvieron entre 1×10^6 y $4,9 \times 10^6$ UFC/mL.

*Los conteos de psicrotrofos en tanque de frío, al 4to día de almacenaje, para leche de cabra

estuvieron entre $2,8 \times 10^5$ y $3,6 \times 10^6$ UFC/mL y para leche de oveja estuvieron entre $2,0 \times 10^4$ y $1,6 \times 10^5$. Los porcentajes de estos en relación a los mesófilos totales fueron mas altos en los meses de octubre y marzo en ambos tipo de leche.

*Los meses comprendidos entre octubre y diciembre en la leche de oveja el deterioro proteico se evidencia al 4to día de almacenaje.

*En la leche de cabra en los primeros meses de lactancia, la actividad proteolitica se evidencia a partir de las 48 horas en el tanque de frío por la mayor presencia de bacterias psicrótrofas, y durante los meses de verano el deterioro se detecta luego de transcurridas 72 horas de refrigeración.

Cuadro 3 Porcentaje de distintos grupos bacterianos, en distintos puntos del proceso de obtención de la leche bovina en dos épocas del año.

Fuente	Psicrotrofos	Staphylococcus	Enterobacterias
Leche directa de ubre			
Invierno	5,3	73,2	21,5
Verano	2	59,8	38,2
Leche recibida en tanque			
Invierno	21,5	54,8	23,7
Verano	18	42,3	39,6
Agua general			
Invierno	1,3	29,9	68,8
Verano	0,9	25,6	73,5
Hisopado de tanque			
Invierno	44,9	34	21,1
Verano	33,8	9,7	56,4

(Carballo, *et al*, 1999)

3.3 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN Y TRATAMIENTO EN LA PROLIFERACIÓN DE LAS BACTERIAS EN LA LECHE

3.3.1 Efecto cuantitativo

La composición de la microflora original puede ser variable en la leche o en los distintos productos lácteos líquidos, se observa una aceleración del desarrollo microbiano, y por lo tanto un crecimiento de la microflora total cuando se eleva la temperatura de conservación entre 35 y 40 °C. Por el contrario, más allá de dicha temperatura, se observa un retardo. Cuanto mas baja es la temperatura, mas se retarda la proliferación microbiana en la leche (Alais, 1985).

3.3.2 Efecto cualitativo

No son las mismas especies las que predominan a las diferentes temperaturas de conservación o de tratamiento. La temperatura tiene un papel selectivo importante, que se aprovecha en las industrias lácteas.

1. Temperaturas medias (20 a 37 °C): en general predomina la flora “mesófila”, la cual provoca la coagulación de la leche por acidificación, sobre todo los **estreptococos**; las bacterias **coliformes**, que son muy tolerantes a las variaciones de temperatura.
2. Temperaturas relativamente bajas (5 a 15 °C): predomina una microflora **psicrótrofa** constituida por bacterias **Gram** – muy diversas, entre las cuales se encuentran gérmenes proteolíticos y lipolíticos. La leche se deteriora entonces muy lentamente.
3. Temperaturas superiores a 40 °C: se seleccionan las especies **termófilas**; en la leche cuajada para la fabricación del grúyere, se favorece el desarrollo de **lactobacilos** hacia los 50 °C.

En las leches pasterizadas se encuentran a veces bacterias termodúricas como las pertenecientes a los géneros: *Microbacterium*, *Bacillus* y *Clostridium*. En las leches hervidas o insuficientemente esterilizadas, las especies esporuladas (*Bacillus* y *Clostridium*) forman la parte esencial de la flora.

En la mayoría de las bacterias psicrótrofas la actividad enzimática óptima se encuentra en una zona de temperatura que no es la de multiplicación activa, especialmente en el caso de las proteasas de los *Bacillus* y *Proteus*, que son mas activas a una temperatura inferior a la de su desarrollo máximo, así como también para *Pseudomonas* y *Flavobacterium*. Existe también la situación inversa, las proteasas de ciertas bacterias psicrótrofas son mas activas a 90 que a 20 °C, y a veces son incluso termoresistentes. (Alais, 1985)

3.4 CALIDAD DE LA LECHE







Desde el punto de vista de la calidad higiénica de la leche, la misma es imprescindible, dada la protección de la salud humana. La inocuidad es una cualidad que depende de dos condiciones:

- la leche debe tener pocos gérmenes microbianos de los considerados como “inocuos” y escasas células somáticas; al mismo tiempo que deben estar exentas de gérmenes patógenos.
- La leche no debe contener sustancias tóxicas o simplemente sospechosas, ya provengan del animal sano o se trate de diversos residuos que lleguen a la leche en el momento o después del ordeño: antibióticos, insecticidas, conservadores, nitratos, toxinas, etc.

Desde el punto de vista tecnológico e industrial, la riqueza de la leche en lípidos, proteínas, extracto seco desengrasado, debe ser lo bastante elevada para asegurar un rendimiento suficiente en las fabricaciones. Por su parte las propiedades físico – químicas de la misma, especialmente el pH, la proporción de Ca ionizado y la relación Ca/N debe encontrarse en un nivel favorable y no deben ser alteradas en el momento de la entrega, con el fin de conservar diferentes aptitudes que son importantes en la práctica: estabilidad térmica, calidad de conservación, coagulabilidad enzimática, desarrollo de bacterias lácticas, etc. Además la microflora inocua, sobre todo la que es especialmente “cimógena” (productora de enzimas, que deterioran la calidad de la leche) debe estar limitada con el fin de evitar accidentes de fabricación. (Alais, 1985)

Con el correr de los años, los parámetros exigidos por la industria, para las leches superiores y las bonificaciones correspondientes, fueron cambiando en Uruguay, siendo a partir de setiembre del 2004 las siguientes exigencias y bonificaciones para las empresas mayores. Por ejemplo para remitir a CONAPROLE las condiciones son:

		CELULAS SOMÁTICAS				
		0 a 400.000	400.001 a 700.000	700.001 a 800.000	800.000 a 900.000	900.001 a 1.000.000
R B	0 a 50.000	18%				
E A	50.000 a 100.000	17,9 a 5 % variable	Categoría transitoria			
C C	100.001 a 120.000					
U T	120.001 a 200.000			7,5 a 2,5 %		
E E	200.001 a 500.000	SIN BONIFICACIÓN				
N R	500.001 a 800.000					
T I	800.001 a > 800.000					
O A			-10%			
N			-20%			
O			-30%			

	Leche de calidad superior. Bonifica un 18%.
	Leche de calidad. Bonifica entre 17,9 y 5 %
	Categ. Transít. Bonifica entre 7,5 y 2,5%
	Calidad básica
	No tiene bonificación
	Leche de calidad inferior, se penaliza.

El número de gérmenes totales no lo expresa todo, es indispensable también determinar el número de coliformes, termoresistentes y psicrótrofos.

3.4.1 Microflora psicrótrofa (su importancia en la conservación de la leche)

La refrigeración de la leche tras el ordeño, reduce mucho la alteración de las leches crudas a causa de las bacterias mesófilas que producen ácido láctico, pero en su lugar puede desarrollarse una microflora psicrótrofa en la que predominan las especies que alteran la composición química de la leche, los más importantes son los géneros: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Enterobacter* y *Acinetobacter*.

La leche a una temperatura de 4 y 5 °C, no está “estabilizada”. Los gérmenes psicrótrofos se desarrollan y producen enzimas. En esta zona de temperatura se encuentra el principal género que deteriora la calidad de la leche en tanque de frío: *Pseudomonas* y entre ellas *P. fluorescens*, y *P. putida*. El tiempo de generación (duplicación de la población) es del orden de 8 horas a 4°C y de 14 hs a 1 °C.

Desde el punto de vista bioquímico, estos gérmenes no atacan activamente a los glúcidos, con producción de ácidos, por el contrario, producen lipasas y proteasas extracelulares que poseen la importante propiedad de ser termoresistentes. Las proteasas resisten un tratamiento UHT corto.

El estudio de la evolución de las sustancias nitrogenadas no proteicas, en el curso de la conservación de la leche en frío, ha puesto de manifiesto cambios característicos, especialmente el aumento de la cantidad de amoníaco, como consecuencia de la actividad de las enzimas de la desaminación.

La consecuencia más perjudicial de la actividad de estos gérmenes es la aparición del sabor a rancio (lipólisis), del sabor amargo (proteolisis) y de sabores impropios difíciles de definir. En general, estos defectos no aparecen hasta transcurridas 48 hs a 4 – 5 °C y son en ocasiones, perfectamente claros a los 3 días en el caso de contaminaciones fuertes (más de 5 millones de gérmenes psicrótrofos). (Alais, 1985)

A modo de ejemplo, en el estudio llevado a cabo por Caraballo y Douglas en Uruguay en el 2002, sobre el deterioro proteico por microorganismos psicrótrofos, los autores observaron que las fracciones de caseína detectadas por electroforesis en cabra y oveja disminuían y en algunas ocasiones desaparecían, lo que indicaba un deterioro de la composición de la caseína de la leche, como fue el caso de la k-caseína caprina en los primeros meses de la lactancia a partir de las 72 horas de almacenaje en tanque de frío. Esto es de importancia en la elaboración de productos lácteos, como por ejemplo en los quesos, en los cuales la integridad de las micelas de caseína se refleja en un mayor rendimiento quesero.

Dichos autores de acuerdo a los resultados obtenidos recomendaban refrigerar la leche caprina y ovina máximo 48 hs, pudiendo llegar a 72 hs dependiendo de la estación del año, condiciones ambientales particulares del año y el manejo general del mismo.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto que tiene la activación del sistema lactoperoxidasa en la evolución de la microflora residente en leche cruda bovina, ovina y caprina en tanque de frío.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- *Medir las concentraciones de tiocianato en las distintas leches, en los distintos momentos del año.
- *Evaluar el efecto de las distintas concentraciones de los componentes que activan el sistema lactoperoxidasa sobre la carga microbiana.
- * Determinar el efecto de los distintos tratamientos, sobre la microflora residente en la leche en distintos momentos del año.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de leche bovina, fueron obtenidas del tambo del señor Ricardo Posse (ubicado en Santa Lucía, departamento de Canelones); y las muestras de leche caprina (razas: Anglo Nubias y Saanen) y ovina (raza: Milchschaaf) del INIA Las Brujas.

El procesamiento y análisis de dichas muestras, se llevó a cabo en el laboratorio de la Unidad de Tecnología de los Alimentos, de la Facultad de Agronomía.

5.1) MUESTREO

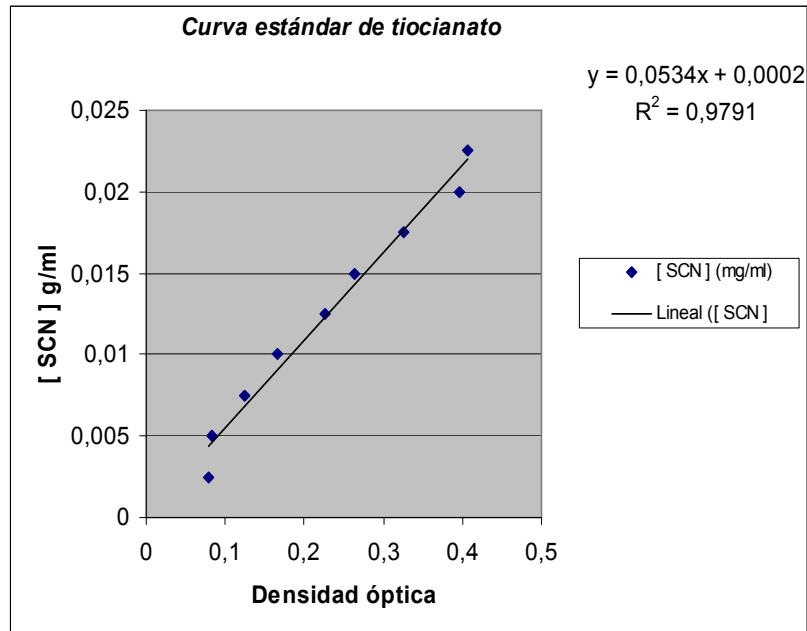
El período de muestreo para la leche de vaca fue desde Setiembre del 2002, hasta Mayo del 2003, y para leche de cabra y de oveja fue desde Octubre del 2002 hasta Febrero del 2003, según el período de ordeño.

5.1.1) TOMA DE MUESTRAS

Las muestras se obtuvieron en recipientes estériles desde el tanque de frío en el momento del ordeño. Las mismas fueron transportadas, refrigeradas y procesadas antes de que transcurrieran dos horas a partir del comienzo del mismo.

5.1.2) MEDICION DEL TIOCIANATO

Previo a la determinación del tiocianato se realizó una curva estandarizada de tiocianato. La curva expresa la concentración contra la absorbancia en un rango entre 0 y 40 mg/L de tiocianato (SCN).



5.1.3) DETERMINACION DEL TIOCIANATO EN LA LECHE

Las muestras obtenidas se analizaron de acuerdo a la técnica descrita por Björck; et al (1975) y por el CODEX ALIMENTARIUS (2000). Se agitaban muestras alícuotas de 4ml, con 2ml de ácido tricloroacético al 20% (p/v) a los 30 minutos de reposo se filtraron. Se utilizó 1 ml del filtrado y se le agregó la misma cantidad de $[\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}]$. La reacción colorimétrica se evaluó en un espectrofotómetro (Shimadzu – UV 1603) a 460 nm de absorbancia.

La concentración de SCN^- se calculó de acuerdo a la ecuación de regresión lineal de la curva estándar.

5.2) ACTIVACION DEL SISTEMA LACTOPEROXIDASA

Para evaluar el efecto de la activación del SLP, sobre la microflora de la leche cruda en las tres especies, se activó el sistema a distintas concentraciones de los reactivos. De esta forma se pudo determinar la eficiencia de las mismas para la leche de cabra, vaca y oveja. Los reactivos que se utilizaron fueron los siguientes:

<u>Preparado 1:</u>	Ácido hipotiocianoso	0.7 g
	Ácido algínico	0.03 g
	Metil etil celulosa	0.02 g

<u>Preparado 2:</u>	Carbonato de sodio	1.7g
	Carboximetil celulosa	0.015g
	Monooleato de polioxietileno	0.015
	Agua	

5.2.1) Concentración de los reactivos

Para llevar a cabo el experimento se utilizaron dos concentraciones de los reactivos. La concentración mas elevada corresponde a la recomendada por el CODEX ALIMENTARIUS, 2000, y la concentración mas baja es tres veces menor a ésta. A la concentración más baja se la denominó T1, y equivale a una concentración de tiocianato de 4.66 mg/l, y a la concentración más alta se la denominó T2, y equivale a una concentración de tiocianato de 14 mg/l.

5.2.2) APLICACIÓN DEL PRODUCTO

Se tomaron muestras de leche de 300 ml y se colocaron en matraces estériles Erlenmeyer, se le adicionaron a cada matraz una sola concentración de 0.666 y 2 ml de la solución activadora. Primero se agregó la solución del preparado 1, se agitaba por 3 minutos y luego se agregó la solución del preparado 2 y se agitó nuevamente. Posteriormente fueron incubados a 5°C. De acuerdo a los resultados obtenidos se eligieron las concentraciones, 0.2 y 0.6 ml, las cuales representan una concentración de SCN- de 1.4 y 4.2 mg/ litro de leche.

5.3) RECUENTO MICROBIOLÓGICO

5.3.1) RECUENTO DE DIFERENTES GRUPOS BACTERIANOS.

Las muestras para realizar este procedimiento se tomaron cada 24 horas de los matraces incubados a 5 °C. A partir de las diluciones decimales seriadas en solución salina fisiológica (0,85%), se transfirieron a distintos medios de cultivo de acuerdo al grupo bacteriano. Las diluciones fueron sembradas en las placas de Petri, por el método de siembra en superficie, en los siguientes medios de cultivo para recuento (UFC/ml):

- * mesófilos aerobios totales, (PCA).
- *enterobacterias totales, (Agar Mc Conkey).
- *estafilococos, (Agar sales manitol).
- *psicrotrofos, (Agar caseína (1%)).

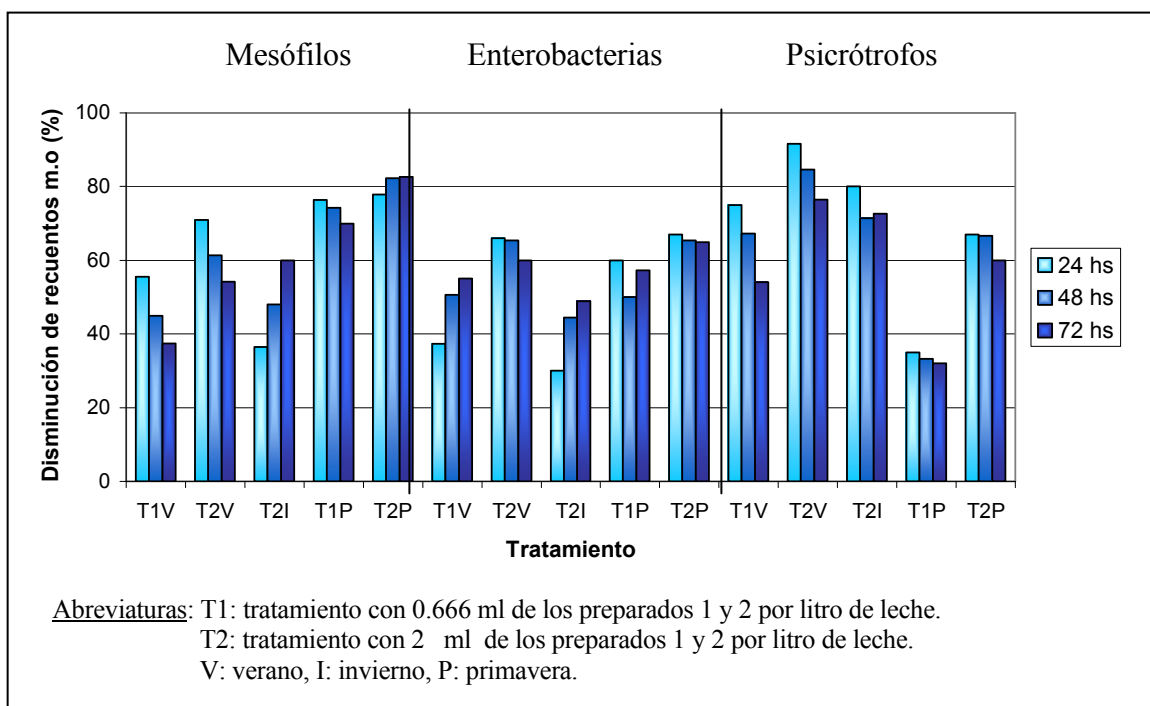
Los mesófilos fueron incubados por 48 horas a 37 °C, y los psicrotrofos fueron incubados a 5 °C por 10 días.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se presentan los porcentajes de muerte de disminución de microorganismos en leche cruda bovina en distintas estaciones del año, y a distintos niveles de activación del sistema Lactoperoxidasa (Tratamiento 1: 0.666 ml/l de leche; Tratamiento 2: 2 ml/l de leche). La segunda dosis, corresponde a la recomendada por el CODEX ALIMENTARIUS, 2000.

6.1 ANALISIS DE LA ACTIVACIÓN DEL SLP EN LECHE CRUDA BOVINA

Figura 1: Porcentaje de disminución de los recuentos microbianos en leche cruda bovina según época del año, tratamiento y grupo de bacterias.



Los resultados de los tratamientos, son en comparación al control de microorganismos viables en la leche cruda bovina (100%).

Los mayores porcentajes de disminución de microorganismos, independientemente de la época del año, se obtienen cuando se utiliza el nivel más elevado de los preparados 1 y 2 en leche (2ml/L de leche).

El mayor impacto sobre los distintos grupos de microorganismos se observa en el recuento de los psicrótrofos, con porcentajes de muerte entre 67 y 91 %, independientemente de la estación del año (con excepción del tratamiento con la dosis más baja en la primavera).

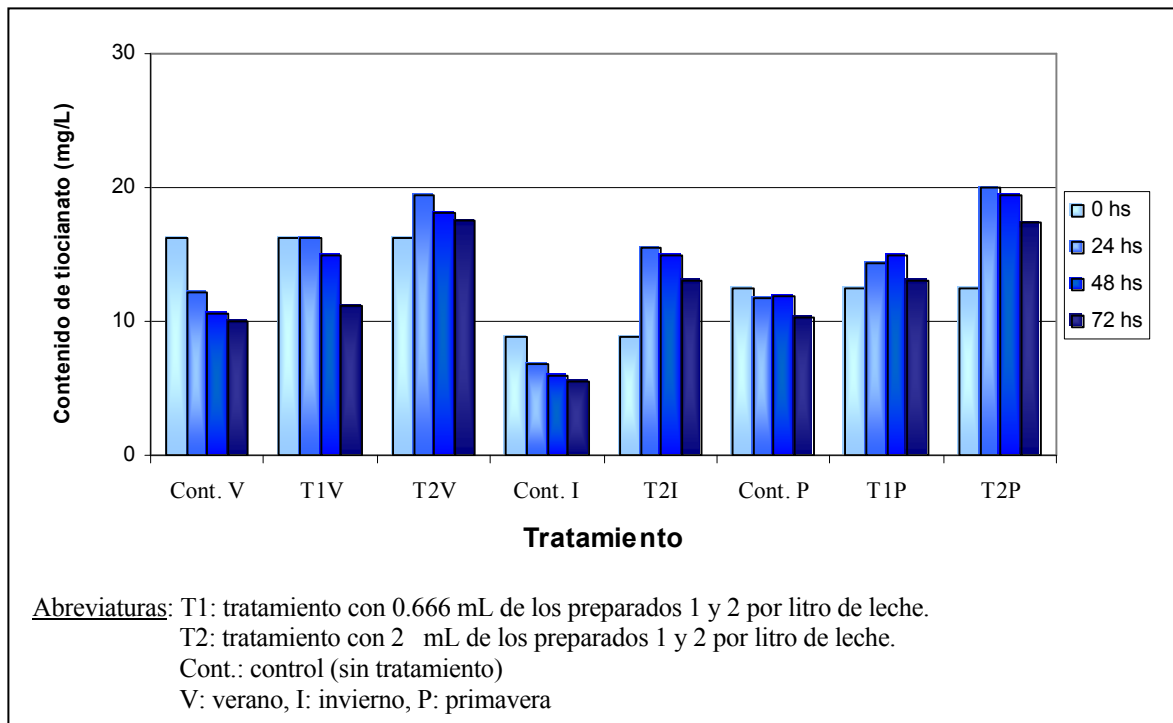
En relación a los recuentos de mesófilos viables totales, el mayor efecto fue en primavera, con porcentajes de disminución de microorganismos superiores a 70 %, en los

dos tratamientos (0.666 y 2 ml/l de leche), en los sucesivos días evaluados. Esto puede ser explicado por una alta concentración de tiocianato en este período (Figura 2), alcanzada con los tratamientos, asociado a un recuento de microorganismos mesófilos totales, para dicha estación, de 4×10^4 .

En verano, se observa que los valores de tiocianato alcanzado con los tratamientos también son elevados (Figura 2), pero los porcentajes de disminución de los recuentos son inferiores, debido a un elevado recuento de microorganismos mesófilos de $2,47 \times 10^5$. En la Figura 1 se observa también, que para el caso de los tratamientos durante el verano, los porcentajes de disminución de los recuentos dependen del tiempo transcurrido. En este caso se observa una disminución en dichos porcentajes con el correr de las horas. Esto puede ser explicado por el hecho de que en el verano existe una alta proporción de la flora mesófila que tiene una menor sensibilidad al SLP, y sobre la cual se ejerce un efecto bacteriostático.

Los resultados obtenidos con el tratamiento 2 para el recuento de enterobacterias totales, indican porcentajes de disminución de los recuentos entre 30 y 67 % a las 24 horas de aplicado el mismo, independientemente de la estación del año. A las 72 horas de aplicado el tratamiento los porcentajes de disminución de los recuentos microbianos se mantuvieron con valores elevados, estando los mismos 48.9 y 64.9 %. Mientras que con el tratamiento 1 en la primavera, el efecto es bactericida sobre las enterobacterias a las 48 horas, activándose nuevamente el sistema, y a las 72 horas existe un mayor porcentaje de disminución de los recuentos. En este punto es importante señalar que un gran número de enterobacterias se pueden comportar como bacterias psicrótrofas, liberando enzimas que afectan la calidad química de la leche. También se debe considerar que si el tiempo de la leche en el tanque de frío se puede extender por más tiempo, es una ventaja para el productor e industria en relación a la recogida de la leche. Actualmente se realiza la misma cada 24 horas y en un máximo de 48 horas.

Figura 2: Evolución del contenido de tiocianato en leche cruda bovina según tratamiento y época del año.

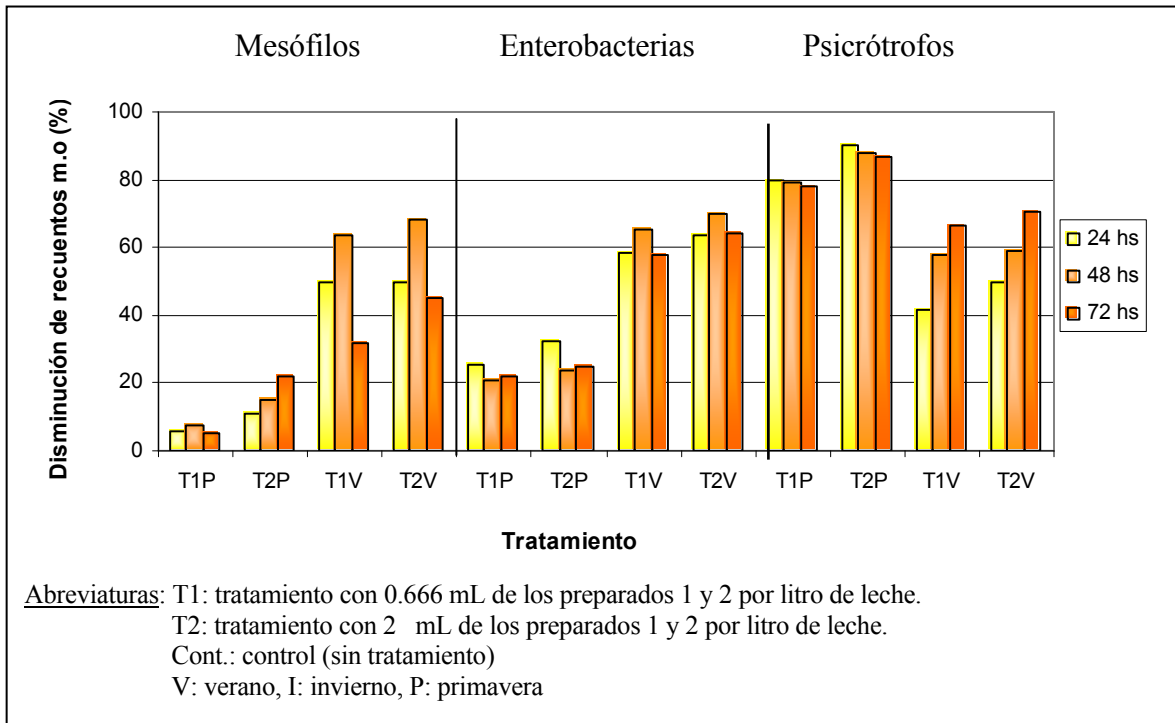


En la Figura 2, se observa claramente que los muestreos realizados durante el verano y la primavera fueron los que alcanzaron los mayores niveles de tiocianato, luego del tratamiento. Esto se explica por los mayores niveles iniciales de tiocianato, encontrados en la leche cruda bovina en las condiciones de alimentación de Uruguay, en estas épocas del año (16.27mg/l en verano, y 12.43 mg/l en primavera). Concentraciones similares fueron encontradas por Reiter, B, 1985, Perraudin et al., 1991 y Haddadin et al, 1996. (Ver Cuadro 1).

Analizando las dos gráficas en conjunto podemos ver que los porcentajes de disminución de los conteos, siguen en términos generales la tendencia de la evolución de los contenidos de tiocianato.

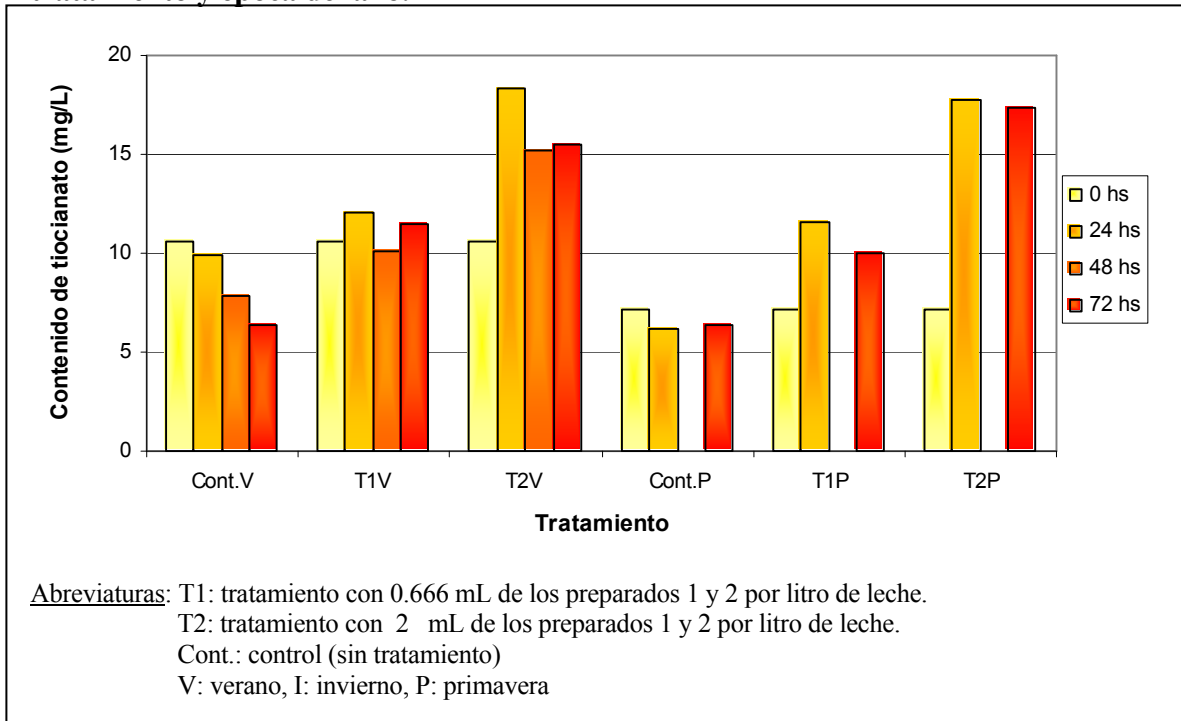
6.2 ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DEL SLP EN LECHE CRUDA CAPRINA.

Figura 3: Porcentaje de disminución de los recuentos microbianos en leche cruda caprina según época del año, tratamiento y grupo de bacterias.



En el caso de los caprinos, si observamos la Figura 3, podemos ver que el tratamiento 2, continua siendo el más efectivo en controlar la microflora, aunque la diferencia entre un tratamiento y otro es menor que para el caso de los bovinos. En cuanto a los porcentajes de disminución, estos son inferiores a los que se obtuvieron en leche cruda bovina. Por otro lado el mayor impacto sigue siendo en la microflora psicrótrófa, con valores de disminución entre 40 y 90 %. En cuanto a las enterobacterias se nota claramente la mayor eficiencia (% de disminución) de los tratamientos en el muestreo realizado en el verano, con respecto a los de primavera. Los porcentajes de disminución de los recuentos para los dos tratamientos durante las 72 horas evaluadas, estuvieron entre 58 y 70 %.

Figura 4: Evolución del contenido de tiocianato en leche cruda caprina según tratamiento y época del año.



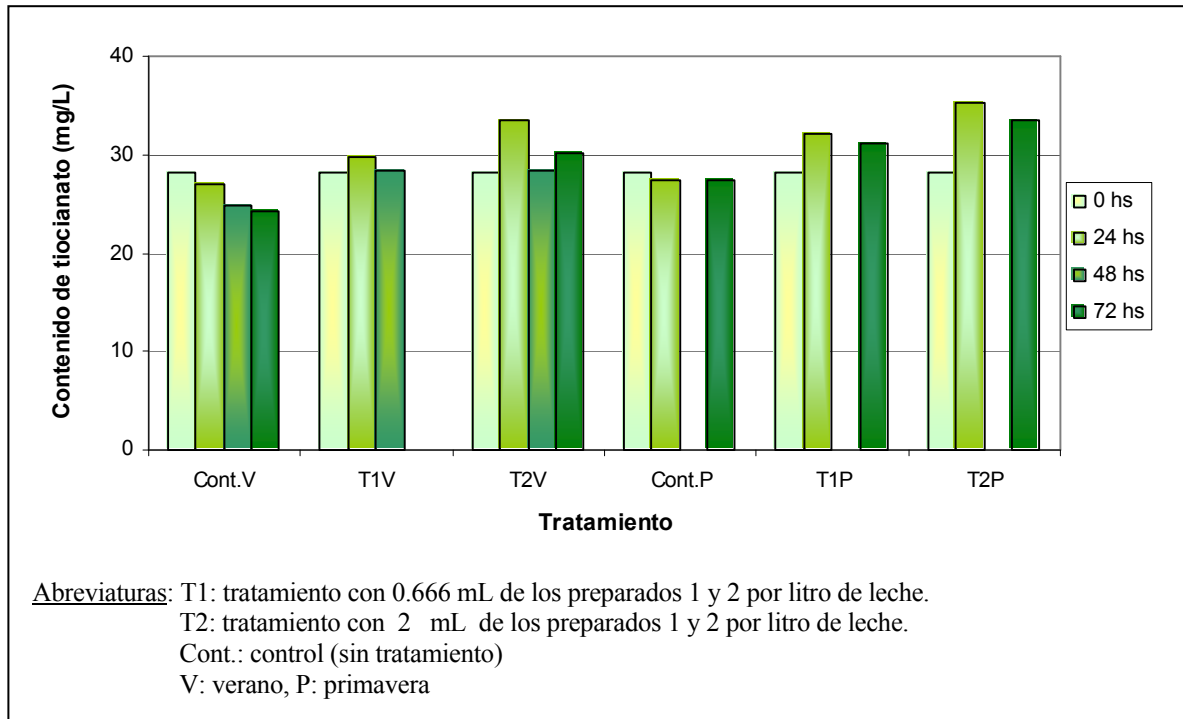
Los bajos porcentajes de disminución de los recuentos, se explican en parte por los bajos valores de tiocianato, incluso inferiores a los encontrados en leche cruda bovina (en verano **10.56 mg/l** en cabra vs. **16.27mg/l** en vaca, y en primavera, **7.2 mg/l** en cabra vs. **12.43 mg/l** en vaca). Además de esto, tenemos el hecho de que los contenidos de bacterias mesófilas en cabra superan en número a los registrados en vaca (6,5 veces mas en primavera; y 1,4 veces mas en verano). Es importante también tener en cuenta que en el verano existe una microflora distinta a la de primavera, en la que predominan géneros más sensibles a la acción del SLP.

6.3 ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DEL SLP EN LECHE CRUDA OVINA

En el caso de los ovinos, los contenidos de tiocianato (Figura 5) fueron muy superiores a los encontrados en leche cruda bovina y caprina, en todos los casos los valores estuvieron por encima de 28 mg/l de leche.

En la figura 5 se puede observar que los valores de tiocianato para el control, en la leche cruda ovina fueron similares para las dos estaciones del año evaluadas. Tanto para la leche control, como para las que fueron tratadas, independientemente de la época del año, los valores de dicho compuesto se mantuvieron con valores elevados a medida que transcurrían los días.

Figura 5: Evolución del contenido de tiocianato en leche cruda ovina según tratamiento y época del año.

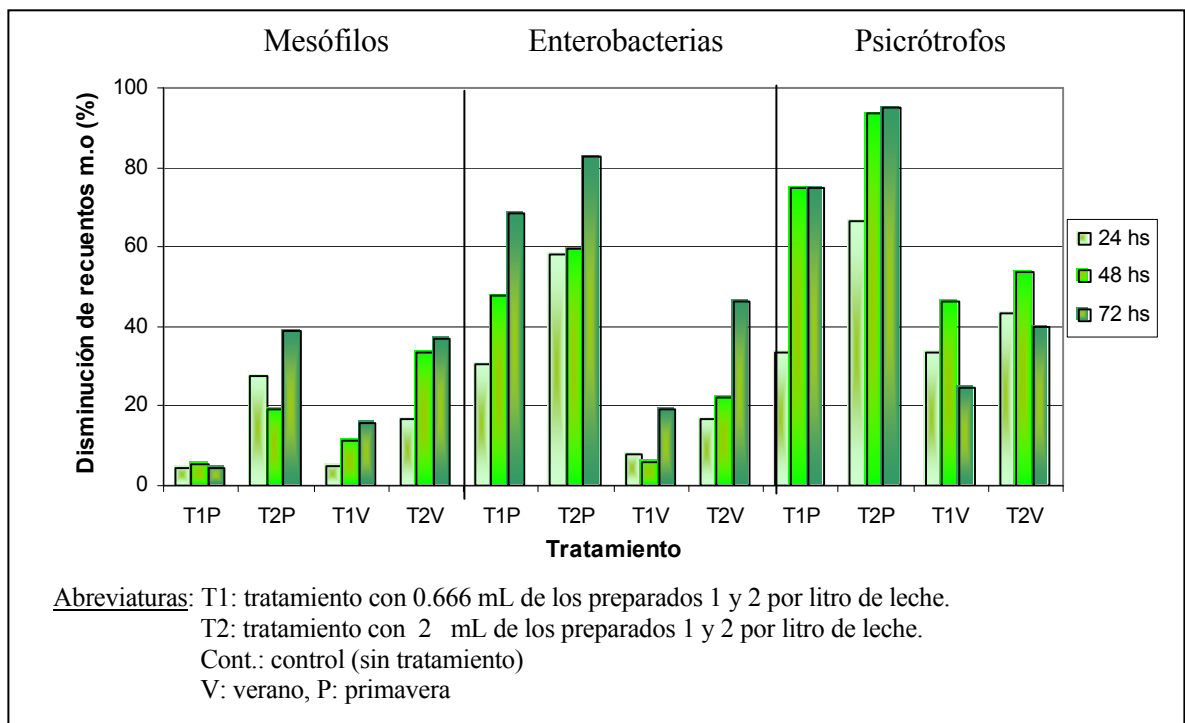


En cuanto a la leche tratada, los incrementos en los valores de tiocianato con respecto al control, son inferiores a lo que se observa para la leche cruda bovina como para la caprina (Figuras 2 y 4 respectivamente), debido a los altos niveles iniciales sin tratamiento.

En la Figura 6 se observa, que el porcentaje de disminución, considerando los distintos grupos de bacterias, sigue siendo mayor para los psicrotrofos. Asimismo, en el total de los resultados de la figura 6, se observa que en algunos casos los porcentajes de disminución son muy bajos, de acuerdo al bajo recuento inicial en la leche cruda. (Figuras, 7, 8 y 10)

Los recuentos de todos los grupos bacterianos en este estudio, en leche cruda ovina, indican los niveles más bajos encontrados en las tres especies evaluadas. En el caso del recuento de enterobacterias, en verano fue $1,3 \times 10^5$ UFC/mL, en la leche control (sin tratamiento), incubadas por 72 horas, y con el tratamiento 1, en el mismo tiempo el recuento fue de 1×10^5 UFC/mL, y para el tratamiento 2 fue de 7×10^4 UFC/mL.

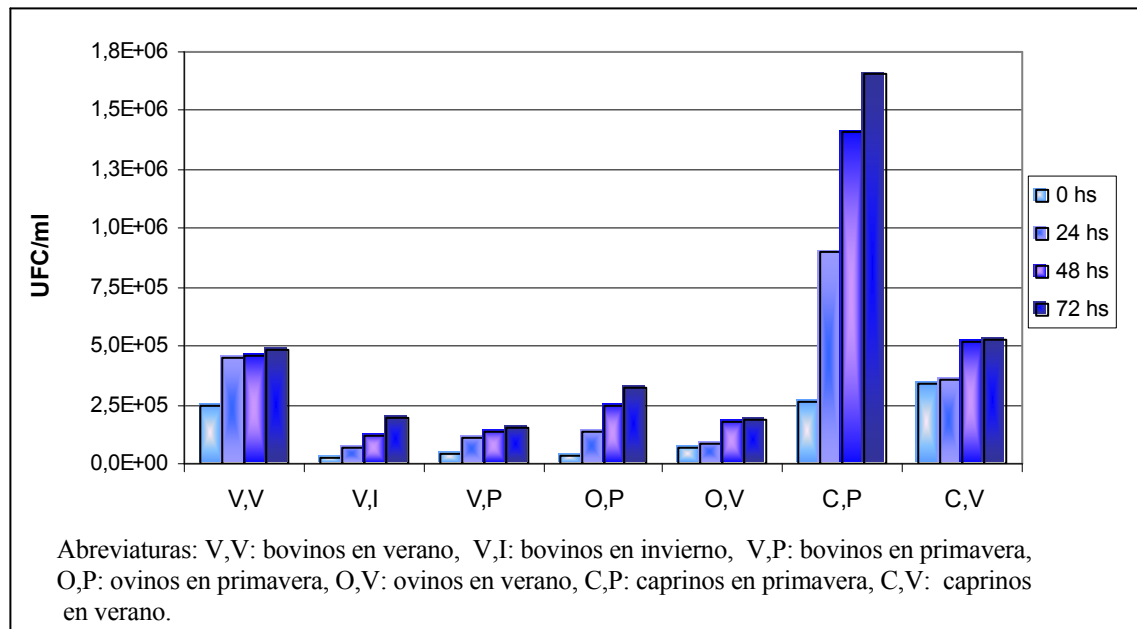
Figura 6: Porcentaje de disminución de los recuentos microbianos en leche cruda ovina según época del año, tratamiento y grupo de bacterias.



6.4 EVOLUCIÓN DE LOS DIFERENTES GRUPOS BACTERIANOS EN LECHE CRUDA SIN TRATAMIENTO DEL SLP.

A continuación se presentan los resultados de la evolución de los distintos grupos de bacterias, de la leche control (sin tratamiento), para las tres especies en las distintas estaciones evaluadas.

Figura 7. Evolución de los mesófilos totales viables en las tres especies, según momento del muestreo, en las leches control.

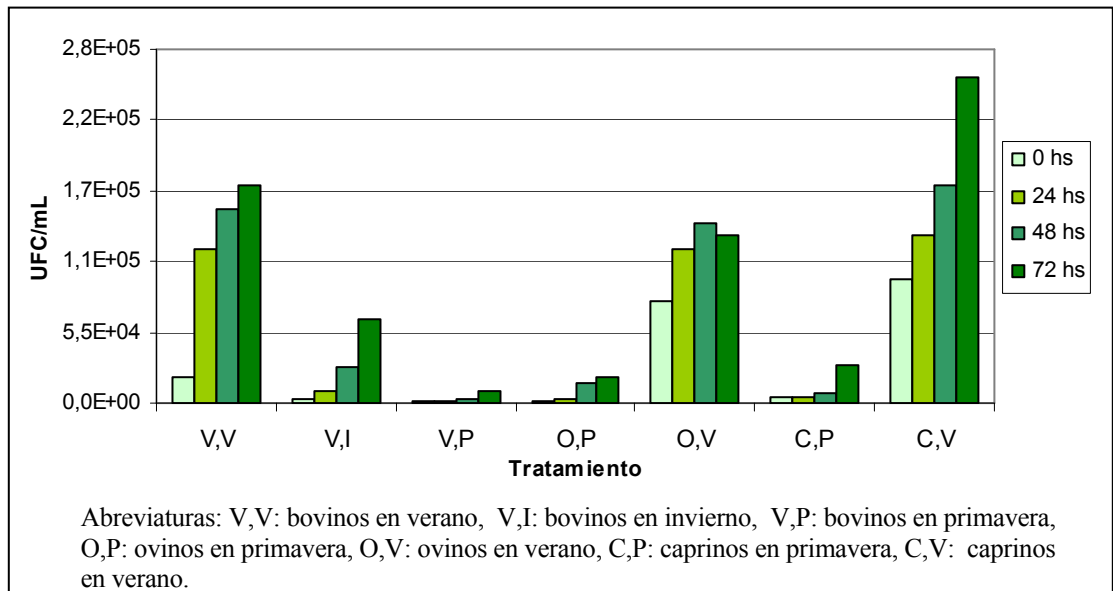


Como se puede observar en la Figura 7, analizando las tres especies en conjunto los mayores conteos de mesófilos aerobios totales en el día cero (toma de la muestra), se registraron durante el verano. En cambio si observamos la evolución de los recuentos a las 24, 48 y 72 horas, para el caso de ovejas y cabras, los conteos son superiores en los muestreos realizados en la primavera.

Para el caso de la leche de cabra, los recuentos iniciales registrados en primavera ($\text{UFC/ml}_{0 \text{ hs}} = 2,6 \times 10^5$), se multiplicaron por 6,4 veces al cabo de 72 horas ($\text{UFC/ml}_{72 \text{ hs}} = 1,66 \times 10^6$), y para los ovinos, en el mismo período de tiempo, los recuentos iniciales ($\text{UFC/ml}_{0 \text{ hs}} = 3,6 \times 10^4$) se multiplicaron por 9 veces ($\text{UFC/ml}_{72 \text{ hs}} = 3,24 \times 10^5$). En el caso de la leche caprina el mayor incremento de las UFC/ml en dicha estación puede estar asociado, a los bajos contenidos de SCN- detectados en este estudio, y para el caso de la leche ovina, los menores recuentos alcanzados pueden ser explicados por la alta actividad natural del SLP y al poder buffer propio de esta leche.

En todos los casos se debe considerar que la microflora presente en los diferentes nichos varía, y el sistema puede tener un efecto bactericida sobre ciertos géneros y especies; y bacteriostático sobre otros (Seifu, et al; 2004).

Figura 8. Evolución de la microflora psicrótrufa viable en las tres especies, según momento del muestreo



Analizando los datos de la microflora psicrotrofa de las tres especies en los distintos momentos muestreado, vemos que los recuentos de UFC/mL, siempre son mayores en la estación estival con respecto a las otras. En este punto se debe considerar que en esta estación es donde el recuento de mesófilos es mayor. Es de esperar que los mayores conteos de psicrótrofos en el verano estén dados porque parte de la microflora mesófila (Enterobacterias) se comporta como psicrótrufa.

Como se puede ver en la Figura 9, existe una relación directa entre la cantidad de mesófilos viables totales, y la proporción de bacterias psicrótrofas. Cuando los recuentos de bacterias mesófilas son mayores, existe una mayor cantidad (UFC/ml) de bacterias psicrótrofas, pero en términos porcentuales representan una proporción menor del total, siendo ésta mayor durante el invierno. De la misma manera ocurre con el grupo de las enterobacterias. A modo de ejemplo, en la leche bovina, el porcentaje de bacterias psicrótrofas, con respecto a los mesófilos totales en la muestra control (sin tratamiento), en el día cero fue 8,1%, 2,2% y 11%, en verano, primavera e invierno respectivamente.

Por su parte la leche cruda bovina presentó, conteos de psicrótrofos en invierno, superiores a los de primavera, aumentando estos en forma importante, en la leche control al cabo de 72 horas (el aumento de los recuentos fue de 22 veces).

Transcurridas las 72 horas del muestreo, la leche que presentó el mayor contenido de bacterias psicrótrofas fue la leche caprina, con un recuento de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL, para el muestreo realizado en el verano.

Fig. 9 Recuentos de bacterias (mesófilos totales, enterobacterias y psicrótrofos), en leche cruda bovina, en los tres momentos evaluados.

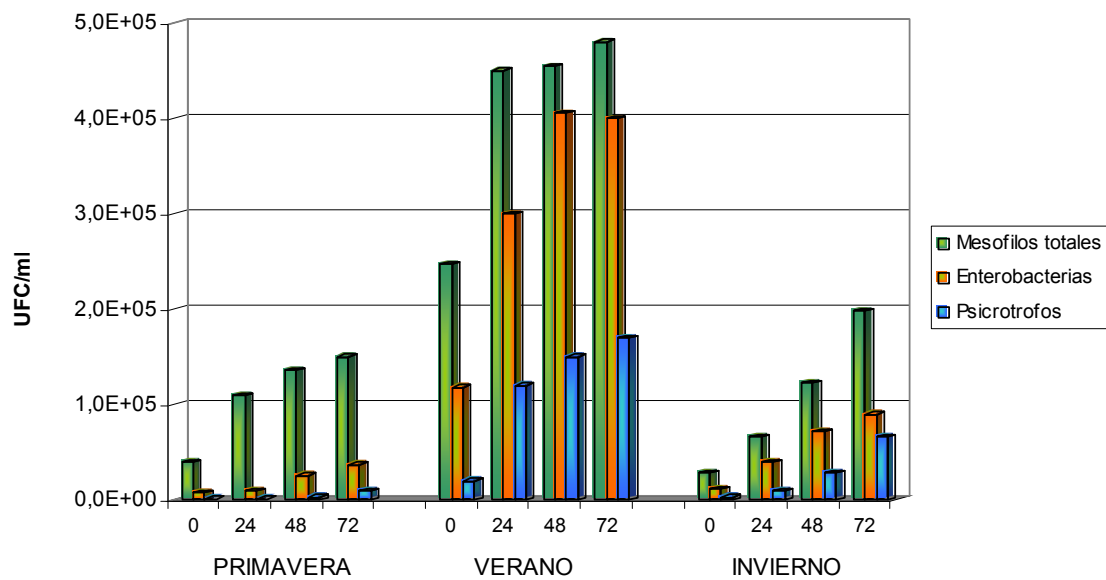
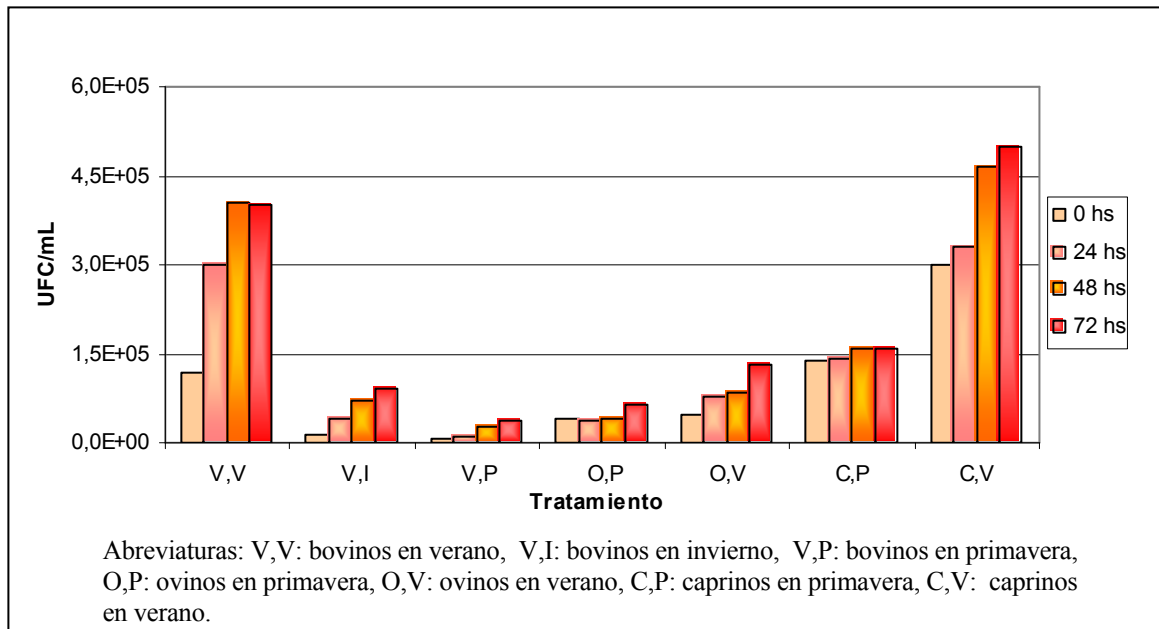


Figura 10 Evolución de las enterobacterias en las tres especies, según momento del muestreo.

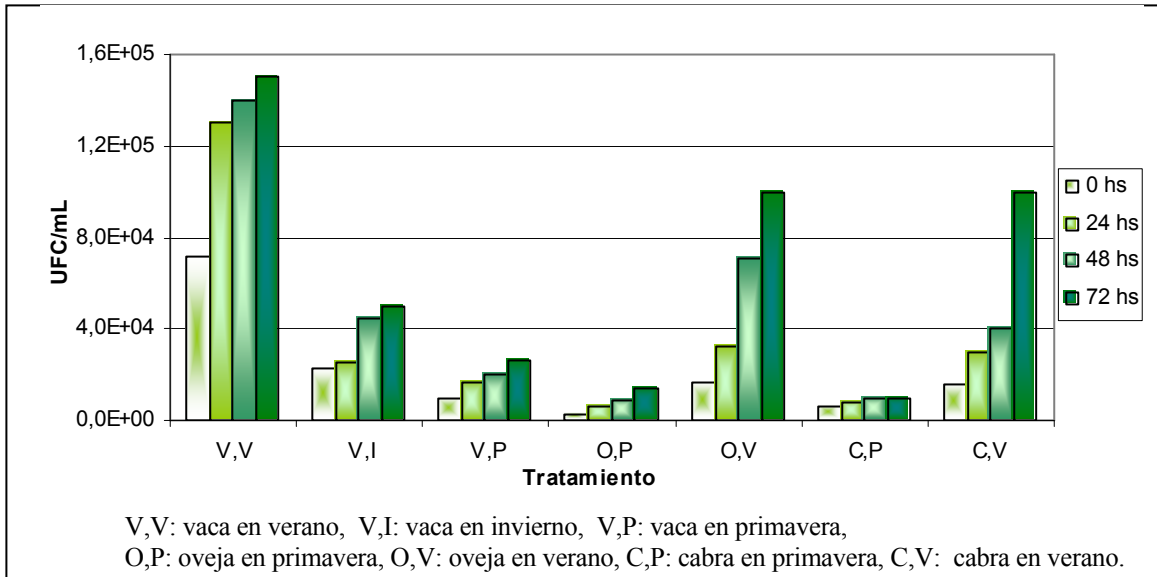


Para el grupo de las enterobacterias se repite, como en los casos anteriores, la mayor abundancia de estos, en la estación estival con respecto a los demás momentos muestreados.

Tanto para la leche cruda caprina como para la bovina, al 4^{to} día muestreado se registraron los mayores recuentos para este grupo de bacterias, siendo los mismos, $5,0 \times 10^5$ UFC/mL y $4,0 \times 10^5$ UFC/mL respectivamente.

Para el resto de los muestreos, como se puede observar en el gráfico 10, los valores registrados, no superaron las $1,6 \times 10^5$ UFC/mL.

Figura 11. Evolución de los estafilococos en las tres especies, según momento del muestreo



En cuanto al grupo de los estafilococos, el verano continúa siendo la estación en la que se registraron los mayores recuentos de UFC/mL. En el caso de la leche cruda bovina en invierno el recuento es alto y se asocia en esta época, a la presencia de mastitis.

Durante todo el muestreo, la leche cruda bovina fue la que presentó los mayores recuentos para este grupo de bacterias, pero en el transcurso de las 72 horas del mismo, las leches crudas ovina y caprina también alcanzaron valores similares, y elevados de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL para ambas (el N° de UFC/mL se multiplicó por 6 veces aproximadamente en las dos leches, en los 3 días).

En leche cruda bovina los recuentos registrados en el invierno superaron a los encontrados en la primavera, alcanzando las $5,0 \times 10^4$ UFC/mL a las 72 horas del análisis.

7. CONCLUSIONES

El presente estudio permitió establecer niveles de activación del SLP y su actividad en la microflora en leche cruda ovina, bovina y caprina.

La concentración de tiocianato en la leche cruda fue mayor para la leche ovina de 28,23 mg/l para las dos épocas evaluadas, incrementando a 33,41 mg/l con el tratamiento a la dosis recomendada (CODEX ALIMENTARIUS, 2000). En relación a este punto hay que resaltar que la concentración de tiocianato es mayor a todas las especies animal estudiadas, debido a los hábitos de pastoreo de los ovinos, al seleccionar rebrotes y leguminosas que contienen compuestos cianogénicos en niveles considerados.

En primavera se reduce la carga de psicrótrofos con el tratamiento 2, en más del 90 %, y en relación a enterobacterias en la misma estación un 83 %.

La concentración de tiocianato en leche cruda caprina, es la que presentó menores concentraciones de tiocianato, de 7,2 mg/l en primavera y 10,56 mg/l en verano. Al activar el SLP con el tratamiento 2, el mismo duplicó la concentración original en verano y la triplicó en primavera. En relación a la disminución de la carga microbiana fue para:

a) psicrótrofos entre 86,6 % y 70 % en primavera y verano respectivamente.

b) enterobacterias, 70 % en verano.

En relación a este punto es claro que el efecto fue mayor sobre psicrótrofos en primavera donde existe predominancia de este tipo de microflora.

La concentración de tiocianato en leche cruda bovina fue de 12,53 mg/l. Al activar el SLP, con los dos niveles de tratamiento, la concentración de tiocianato aumento, y se mantuvo por 72 horas, llegando a 16 mg/l. Esta concentración de acuerdo a antecedentes bibliográficos es suficiente para sostener la actividad antimicrobiana previa al procesamiento artesanal o industrial de la leche. La reducción de la carga microbiana para **a)** psicrótrofos es del 91 % en verano, con un recuento mayor de mesófilos aerobios (casi 5×10^5) con el tratamiento 2. En invierno el recuento de psicrótrofos fue de 6.6×10^4 con el mismo tratamiento la reducción fue hasta 80 %, partiendo de un recuento de mesófilos aerobios menor. En esta época es donde es claro el deterioro de la leche en el tanque de frío por las enzimas liberadas por este grupo de microorganismos, y su control es radical **b)** Enterobacterias, el porcentaje de reducción de la carga microbiana fue entre 30 y 67 % a las 24 horas de aplicado el tratamiento 2, e independientemente de la estación del año.

En relación a los recuentos de mesófilos aerobios en la leche cruda bovina, ambos tratamientos redujeron este tipo de microflora en mas de un 70 % (en primavera) y en mas de 36 % (en verano, al igual que invierno). Mientras que para la leche ovina el tratamiento 2 fue el más eficiente en reducción de viables totales, entre 20 y 40 % (primavera – verano). En esta especie animal es mayor el efecto (disminución de los recuentos) fue en

los grupos de enterobacterias y psicrótrofos. Asimismo, en leche caprina el control es mayor en los dos tratamientos en verano, disminuyendo la carga mesófila entre 33 a 68 %.

En la búsqueda de nuevas alternativas tecnológicas que nos permitan mantener la calidad de la leche por más tiempo en el tanque de frío antes de ser procesada, la activación del SLP puede ser una gran opción de interés en la industria láctea uruguaya, de acuerdo a los datos obtenidos en este proyecto de investigación.

8. RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) Medir las concentraciones de tiocianato, para las tres especies en distintos momentos del año. 2) Evaluar el efecto de distintas concentraciones de los componentes que activan el SLP, sobre la carga microbiana. 3) Determinar el efecto de los distintos tratamientos, sobre la microflora residente en la leche en distintos momentos del año. Las muestras de leche bovina, fueron obtenidas del tambo del señor Ricardo Posse (Santa Lucia, departamento de Canelones); y las muestras de leche caprina y ovina del INIA Las Brujas. El período de muestreo para la leche bovina fue desde septiembre del 2002, hasta mayo del 2003, y para la leche caprina y ovina fue desde octubre del 2002 hasta febrero del 2003. Las muestras se obtuvieron en recipientes estériles desde el tanque de frío en el momento del ordeño, las mismas se procesaron dentro de las dos horas inmediatas al mismo. A partir de las muestras de leche cruda de las tres especies, se tomaron 3 alícuotas de 300 ml, una de las cuales se mantuvo como control y las dos restantes fueron sometidas a tratamiento. Fueron consideradas dos concentraciones de los reactivos, T1 y T2. La primera representa una adición de tiocianato del orden de 4.66 mg/l y la segunda equivale a la adición de 14 mg/l de tiocianato. En cuanto a la concentración de tiocianato, registrada en las tres especies, la leche cruda ovina fue la que presentó los mayores valores de dicho compuesto, siendo de 28,2 mg/l para las dos estaciones evaluadas, alcanzando una concentración de 33,41 mg/l, con el tratamiento 2 (14 mg/l de SCN). Por su parte la leche cruda caprina, fue la que presentó la menor concentración de este compuesto, siendo de 7,2 mg/l en primavera y 10,56 mg/l en verano. Al activar el SLP con el tratamiento 2, el mismo duplicó la concentración original en verano y la triplicó en primavera. La leche cruda bovina presentó valores intermedios entre las dos leches anteriores, encontrándose un valor promedio de 12,53 mg/l. Al activar el SLP, con los dos niveles de tratamiento, la concentración de tiocianato aumento, y se mantuvo por 72 horas, llegando a 16 mg/l. Con respecto a los dos tratamientos evaluados (T1= 4,66mg/l y T2= 14mg/l), el T2 fue el que presentó mayores porcentajes de disminución de los recuentos de los distintos grupos microbianos evaluados. Dentro de éstos el grupo de bacterias más sensible a los tratamientos fueron los psicrótrofos. Para los ovinos, el T2 en primavera redujo los recuentos de psicrótrofos en más de un 90%, para los caprinos la reducción fue de un 86,6 % en primavera y de 70% en verano, y para la leche cruda bovina, los porcentajes de disminución fueron de 91% y 80% en verano e invierno respectivamente. En cuanto al efecto del tratamiento, sobre el grupo de las enterobacterias, para los ovinos los porcentajes de disminución para el T2 fueron de 83%, para los caprinos en verano el porcentaje de disminución fue de 70%, y para los bovinos, los porcentajes de disminución estuvieron entre 30 y 67% independientemente de la estación del año. Para el grupo de mesófilos totales, en leche cruda ovina el T2 redujo los recuentos en 20 y 40% en primavera y verano respectivamente, en leche cruda caprina los porcentajes de disminución para el T2 en verano, estuvieron entre 33 y 68%, y para la leche bovina, ambos tratamientos redujeron los recuentos de mesófilos totales en la primavera al 70%, y en verano e invierno la disminución fue mayor al 36%.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. ALAIS C. 1985. Ciencia de la leche. Principio de técnica lechera. España, Reverté, S.A. 873 p.
2. ALICHANIDIS, E.; POLICHRONIADOU, A. 1996. Special features of dairy products from ewe and goat milk from the physicochemical and organoleptic point of view. In: Proceedings, production and utilization of ewe and goat milk. Crete, Greece, Oct. 19 – 21, 1995; International Dairy Federation Publ., Brussels, Belgium, pp. 21 – 43.
3. ALTHAUS R. L, MOLINA M. P., RODRIGUEZ M. and FERNANDEZ N. 2001. Analysis time and lactation stage influence on lactoperoxidase system components in dairy ewe milk. American Dairy Science Association. 84: 1829 – 1835.
4. ASSENAT, L. 1991. Composición y propiedades. In: Leche y productos lácteos. Vol. 1. Luquet, F. Zaragoza, Acribia. pp. 277 - 313
5. BARRETT N. E, GRANDISON A. S. and LEWIS M. J. 2002 ? Thermal destruction curves of lactoperoxidase between 67 and 75 degrees Celsius. <http://www.confex.com/ift/98annual/accepted/94.htm>
6. BARRETT N. E., GRANDISON A. S. and LEWIS M. J. 1999. Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk. Journal of Dairy Research. 66: 73 – 80.
7. BJÖRCK L., O CLAESSON. and W. SCHULTHESS. 1979. The lactoperoxidase / thiocyanate / hydrogen peroxide system as a temporary preservative for raw milk in developing countries. Milchwissenschaft. 34: 726
8. BJÖRCK L., MULLAN M., STADHOUDERS J. and HEESCHEN W.1991 Significance of the indigenous antimicrobial agents of milk to the dairy industry. Bulletin of the International dairy Federation 264: 2 - 16
9. BJÖRCK L.; ROSÉN C-G.; MARSHALL V. and REITER B. 1975. Antibacterial activity of the Lactoperoxidase System in Milk against Pseudomonads and other Gram-Negative Bacteria. Applied Microbiology 30 (2): 199 – 204.
10. BOULANGÈ M, HANK K and VERT P. 1963. Fluctuation saisonnière du taux des thiocyanates dans le lait frais de vache. CR. Soc Biol 157, 1074 – 1076.

11. CARBALLO, A., ILUNDAIN, M., INCIARTE, J. y LATASTE, J. 1999. Estudio de la contaminación microbiana en la leche en seis tambos del departamento de Flores en dos épocas del año. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay, Facultad de Agronomía. 61p.
12. CHUNG J. and WOOP J. L. 1970. Oxidation of thiocyanate to Cyanide and Sulfate by the Lactoperoxidase – Hydrogen Peroxide System. Archives of biochemistry and Biophysics 141: 73 – 78.
13. COUSIN, M. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. Journal of Food Protection. 45 (2): 172 – 207
14. COUSINS, C. y BRAMLEY, A. 1987. Microbiología de la leche cruda. In: Microbiología lactológica. Robinson, R.K. Zaragoza, Acribia. V.1, pp. 109 – 150.
15. COTTIER, H. 1991. Producción de leche de oveja. In: Leche y productos lácteos. Luquet, F. Zaragoza, Acribia. V.1, pp. 315 – 329.
16. FAO/OMS. 2000. CODEX ALIMENTARIUS: Leche y productos Lácteos. Directrices para la conservación de la leche cruda mediante la aplicación del Sistema de la Lactoperoxidasa. Roma, FAO V. 12: 125 – 130.
17. FAO/ONU. 2000. Manual sobre el uso de la lactoperoxidasa en la manipulación y la conservación de la leche. Roma, Servicio de Producción Animal. Dirección de Producción y Sanidad Animal de la FAO., 31p.
18. GAYA, P, M. MEDINA and M. NUÑEZ. 1991. Effect of the lactoperoxidase system on Listeria monocytogenes behavior in raw milk at refrigeration temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3355 - 3360
19. HADDADIN, IBRAHIM and ROBINSON. 1996 Preservation of raw milk by activation of the natural lactoperoxidasa systems. International Dairy Federation. SI9603: 89 – 94.
20. HÄRNULV, B.G., and C. KANDASAMY. 1982. Increasing the keeping quality of milk by activation of its lactoperoxidase system. Results from Sri Lanka. Milchwissenschaft 37: 454.
21. HULL, R, TOYNE; S., HAYNES, I. and LEHMANN, F. 1992. Thermotolerant Bacteria: A: A reemerging problem in cheesemaking. Australian J. Dairy Technol., 47: 91 – 94.
22. LAEMMLI, D.K. Nature (London) 1970, 227, 680 – 685.
23. LAMBERT J. C. The lactoperoxidase system of milk preservation.

<http://www.fao.org/ag/aga/agap/lps/dairy/mpv/lactoperoxidase/glpage.htm>

24. LOSNEDAHL K. J.; WANG H.; ASLAM M; SIXIANG Z; and HURLEY W. L. 1996. Antimicrobial Proteins in Milk.

<http://classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/antimicroprot IDR.html>

25. MARTÍNEZ, C.E, P. MENDOZA, F.J. ALARCON and H.S. GARCIA. 1988. Reactivation of the lactoperoxidase system dur

26. MAZZUCHELLI P. y FULLE G. 2002. Evaluación del deterioro proteico por psicrotrofos en leche ovina y caprina en tanque de frío. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay, Facultad de Agronomía. 58p.

27. MEDINA, M. P. GAYA, and M. NUÑEZ. 1989. The lactoperoxidase system in ewes milk: levels of lactoperoxidase and thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 8: 147.

28. OZDEMIR H., AYGUL I. and KÜFREVIÖGLU I. 2001. Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of the kinetic properties. *Prep. Biochemistry & Biotechnology*, 31 (2): 125 – 134.

29. PERRAUDIN J. 1991. Protéines à activités biologiques: lactoferrine et lactoperoxydase. Connaissances récemment acquises et technologies d'obtention. *Le Lait* 71 (2) : 121 – 258.

30. PIARD J.C. and DESMAZEAUD M.1991. Facteurs inhibiteurs produits par les bactéries lactiques. 1. Métabolites de l'oxygène et produits du catabolisme. *Le Lait* 71 (5) : 525 – 598.

31. PONCE. P; CAPDEVILLA J.; ALFONSO H.A.; LOPEZ M.G.; LEON R. Y TABOADA A. 1992 Conservación de la leche en Cuba mediante la activación del sistema Lactoperoxidasa. Encuentro taller sobre el control de calidad de la leche. Edición UAMX/CENLAC – CENSA. Mex, D.F, pp 25.

32. PRUITT K. M, and REITER B. 1985. Biochemistry of peroxidase system: antimicrobial effects. In: *The lactoperoxidase system* (PRUITT KM, TENOVUO J, eds) Immunology Series; M Dekker Inc, NY, (27): 143 – 178.

33. REITER, B. 1985 Lactoperoxidase system of bovine milk. Page 123 In: *The lactoperoxidase system: chemistry and biological significance*. K. M. PRUITT and J. O. TENOVUO, ed. Immunol. Ser. Vol. 27. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.

34. ROMBAUTS. W.A., SCHROEDER W.A and MORRISON M. 1967. Bovine Lactoperoxidase. Partial Characterization of the Further Purified Protein. *Biochemistry* 6(10): 2965 – 2977.
35. SEIFU, E; BUYS, M. S; DONKIN, E. F. and PETZER, I. M. 2004 Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against food – borne pathogens in Saanen and South Africans Indigenous goat milk. *Food control*, 15 (6), 447 - 452
36. SHUREN, G. 1989. Producer microorganisms. In: *Enzymes of psychrotrophs in raw food*. Mc Kellar, R. Florida, CRS Press. pp. 3 – 34.
37. THOMAS, E. L, 1981. Lactoperoxidase - catalyzed oxidation of thiocyanate: The equilibrium between oxidized forms of thiocyanate. *Biochemistry* 20: 3273 – 3280.
38. TIRARD – COLLET, P.; ZEE, J.; CARMICHAEL, L. and SIMARD, R. 1991. A study of the microbiological quality of goat milk in Quebec. *Journal of Food Protection*. 54 (4): 263 – 266.
39. VIEJO, J. 2000. Importancia de los psicrótrofos en la leche y sus productos. Monografía del primer año del Master en Ciencia e Ing. de los Alimentos. Colonia, Uruguay. Centro Politécnico del Cono Sur. 120 p.
40. VIRTANEN, A. I. (ed.). 1963. Investigations on the alleged goitrogenic properties of milk. Biochemical Institute Helsinki.
41. WONG C. W., WATSON D. L., REGESTER G.O. and SMITHERS G. W.Y., 1998 Comparison of immunomodulatory properties of purified lactoferrina, lactoperoxidase and beta- casein in sheep. *Journal of Dairy Research* 65: 697 – 701.
42. WOOD, J. L. 1975. Biochemistry. Page 156 In: *Chemistry and biochemistry of thiocianic acid and its derivatives*. A.A. Newman, ed. Academic Press, London, Engl.
43. YOSHIDA S. and XIUYUN – YE. 1991. Isolation of Lactoperoxidase and Lactoferrins from Bovine Milk Acid Whey by Carboxymethyl Cation Exchange Chromatography. *Journal of Dairy Science* 74 (5):1439 – 1444.
44. ZAPICO P., GAYA P., DE PAZ M., and MEDINA M. 1991. Influence of breed, animal and days of lactation on lactoperoxidase system components in goat milk. *Journal of Dairy Science* 74 (3).
45. ZUNIGA P. RICARDO. 2001. Validación del sistema Lactoperoxidasa en la conservación de la leche durante el transporte sin refrigeración en condiciones tropicales. Tesis Ing. Agr. Catamarca, Olancho, Honduras. Escuela Nacional de Agricultura. 52p.