

INFLUENCIA DEL TIEMPO SOBRE EL ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA LACTOPEROXIDASA EN LA LECHE DE OVEJA

Althaus, R.L.; Molina, M.P.

Departamento de Ciencia Animal - Universidad Politécnica de Valencia - Camino de Vera, 14.
Apartado 22012. 46071 Valencia, (España).

INTRODUCCIÓN

El sistema lactoperoxidas (LP) está asociado a la actividad antimicrobiana que presenta la leche, ya que su acción inhibidora está relacionada con la defensa del ganado lechero frente a ciertas infecciones.

Esta acción antimicrobiana se consigue solamente cuando están presentes la enzima LP, el ión tiocianato y el peróxido de hidrógeno. Los iones hipocianato (OSCN^-), cianosulfuroso (O_2SCN^-) y cianosulfúrico (O_3SCN^-), generados por la peroxidación del tiocianato, constituyen los inhibidores naturales de este sistema.

Desde el punto de vista tecnológico, el sistema LP tiene importancia como mecanismo de preservación de la leche, ya que podría ser empleado para prolongar el tiempo de almacenaje de la leche en aquellos países donde no se dispone de los sistemas de refrigeración adecuados (Ridley *et al*, 1990; Witt y Van Hooydonk, 1996).

La mayoría de los estudios del sistema LP en leche han tenido como objetivo evaluar la acción antimicrobiana frente a diferentes microorganismos, siendo muy escasos los trabajos que analizan los cambios de las concentraciones de sus componentes con el tiempo de conservación (Martínez *et al*, 1988; Stefano *et al*, 1995).

Por este motivo, el objetivo del presente trabajo ha sido analizar la evolución de los componentes del sistema LP en leche de ovejas de la raza Manchega con el tiempo de análisis y evaluar de este modo su posible efecto antimicrobiano.

MATERIAL Y MÉTODOS

1 . Muestras de leche y métodos analíticos.

Se utilizaron 48 muestras de leche de ovejas de raza Manchega correspondientes a animales individuales. Sobre las muestras de leche, conservadas a 4°C, se realizaron las siguientes determinaciones fotométricas (espectrofotómetro UV-Visible - Shimadzu UV-1601) a las 6, 12, 24 y 48 horas luego de su extracción:

- Actividad de la LP: Según el método descrito por Pruitt y Kamau (1993), realizando las lecturas de absorbancias a 412 nm a tiempos de 3 y 5 minutos.

- Concentración de SCN^- : Previa desproteinización con tricloroacético (60% p/v), extracción de la materia grasa con cloroformo y posterior reacción con $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 3 realizando las lecturas fotométricas a 460 nm (Banks y Boad, 1985)

- Concentración de peróxido de hidrógeno: Utilizando la técnica de Mottola *et al* (1970) midiendo las lecturas de absorbancia a 596 nm .

2 . Métodos estadísticos

El análisis estadístico utilizado para estudiar el efecto del tiempo de análisis sobre las concentraciones de los componentes del sistema lactoperoxidasa se realizó mediante el procedimiento GLM (General Model Lineal) para muestras repetidas, del paquete estadístico SAS® (SAS, 1996), utilizando el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + t_i + O_j + t*O_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Siendo: Y_{ijk} = variable dependiente; μ = media general; t_i = tiempo de análisis ($n=4$); O_j = oveja ($n=48$); $t*O_{ij}$ = interacción tiempo-oveja y ε_{ijk} = error residual del modelo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se resumen los cambios en las concentraciones de los componentes del sistema LP determinados en leche de oveja de la raza Manchega a diferentes tiempos de análisis (6, 12, 24 y 48 horas). Se observa una disminución gradual en la concentración de la enzima a medida que transcurre el tiempo de análisis, resultando significativa su diferencia cuando las determinaciones se realizan a las 48 h. Las concentraciones de LP medidas a las 48 h. se encuentran entre los rangos determinados en leche de oveja por Medina et al (1989) (0,61 - 1,05 U/ml) y Uceda et col. (1994) (0,54 - 0,85 U/ml), mientras que las obtenidas a los otros tiempos de análisis, presentaron valores ligeramente superiores.

Tabla 1: Concentraciones de los componentes del sistema LP a diferentes tiempos de análisis.

Componente	Tiempo de análisis (horas)			
	6 (n= 48)	12 (n= 45)	24 (n=40)	48 (n=40)
LP (U/ ml)	1,47 _a ± 2,21	1,15 _a ± 1,01	1,16 _a ± 1,04	0,60 _b ± 0,63
SCN ⁻ (mg/l)	9,62 _a ± 2,72	6,30 _b ± 3,34	4,89 _c ± 2,78	5,24 _{bc} ± 2,82
H ₂ O ₂ (mg/l)	1,76 _a ± 0,35	0,66 _b ± 0,44	0,12 _c ± 0,08	0,13 _c ± 0,03

a, b, c : diferentes índices en una misma fila indican diferencias significativas a $p < 0,05$.

Con respecto a la concentración del ión SCN⁻, se observó una disminución significativa cuando los análisis se realizan a las 12 y 24 horas, para mantenerse luego aproximadamente constante. Los valores de SCN⁻ determinados en este trabajo son similares a los rangos reportados por Medina et al, (1989) para ovejas de la raza Manchega, (6,98 - 12,06 mg/l), sin embargo hay que señalar que la concentración de este ión se ve afectada por un gran número de factores, como la especie, raza y alimentación entre otros (Wolfson y Sumner, 1993).

Las concentraciones de H₂O₂ determinadas a las 6 horas de extraída las muestras de leche, disminuyeron significativamente cuando los análisis se realizaron a las 12 y 24 horas, no observándose diferencias significativas entre las 24 y 48 horas.

La disminución en las concentraciones de tiocianato y peróxido de hidrógeno con el tiempo de conservación de la leche ha sido observada por Martinez et al (1988) y Stefano et al (1995) en muestras de leche de vaca a las cuales se había activado el sistema LP mediante la adición equimolecular de 0,25 mM de SCN⁻ y peróxido de hidrógeno, lo cual se explica por la continua transformación que experimentan ambos

compuestos a las especies hipocianato (OSCN^-), cianosulfuroso (O_2SCN^-) y cianosulfúrico (O_3SCN^-), inhibidores del desarrollo de los microorganismos.

Si bien la activación del sistema LP se lleva a cabo cuando la concentración de SCN^- está comprendida entre 10 y 15 mg/l y la de H_2O_2 es de 9 mg/l aproximadamente (Zapico et al, 1991; Mee, 1994; Santos et al, 1994), las concentraciones de SCN^- (4,89 – 9,62 mg/l) y H_2O_2 (0,12 – 1,76 mg/l) obtenidas no parecen ser suficientes para activar el sistema LP. Sin embargo, podría esperarse cierto efecto antimicrobiano durante las primeras horas de extraídas las muestras de leche, ya que las concentraciones de sus componentes son superiores.

CONCLUSIONES

El tiempo de análisis de los componentes del sistema LP afecta a sus concentraciones, ya que tanto el ión tiocianato como el H_2O_2 son transformados enzimáticamente a sus productos con acción antimicrobiana. Se observó una disminución significativa en las concentraciones de SCN^- (desde 9,62 hasta 6,30 ppm) y de H_2O_2 (desde 1,76 hasta 0,66 ppm) cuando los análisis se realizan a las 12 horas, mientras que la actividad de LP disminuyó significativamente desde 1,47 hasta 0,60 U/ml para las determinaciones efectuadas a las 48 hs.

Por este motivo resulta conveniente unificar el tiempo de realización del análisis en los diferentes laboratorios lactológicos, a fin de obtener resultados más representativos en lo que respecta a recuentos de gérmenes y respuestas a los métodos de inhibidores, ya que podrían verse influenciados por la actividad antimicrobiana del sistema LP.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del Proyecto ALI98-0363 financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología del Ministerio de Educación y Cultural.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANKS, J.G.; BOARD, R.G., 1985. *Letters in Applied Microbiology*, 1, 81-85.
MARTINEZ, C.E.; MENDOZA, P.; ALARCON, F.J.; GARCIA, H.S. 1988. *Journal of Food Prot.*, 51 (7): 558 - 561.
MEE, J.F., 1994. *Irish Veterinary Journal*, 47, 172-174.
MEDINA, M.; GAYA, P.; NUÑEZ, M., 1989. *Letters in Applied Microbiology*, 8, 147-149.
MOTTOLA, H., SIMPSON, B.E.; GORIN, G., 1970. *Analytical Chemistry*, 42 (3), 410-411.
PRUITT, K.M.; KAMAU, D.N., 1993. *FIL Boletín* 283, 72-86.
RIDLEY, S.C.; SHALO, P.L. 1990. *Journal of Food Protection*, 53(7): 592 - 597.
SANTOS, J.A.; LÓPEZ-DÍAZ, T.M.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, M.C.; GARCÍA-LÓPEZ, M.L.; OTERO, A., 1994. *Milchwissenschaft*, 50, 690-692.
SAS® User guide statistics. Version 6.12. Edición 1996. SAS Institut. Cary, NC.
STEFANO, G. De.; PIACQUADIO, P.; SCIANCALEPORE, V. 1995. *Latte*, 20 (10): 1128 - 1131.
UCEDA, R.; PICON, A.; GUILLEN, A.M.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. 1994. *Milchwissenschaft*, 49 (12): 678 - 683.
WIT, J.N.; VAN HOOLYDONK, A.C.M. 1996. *Netherlands Milk & Dairy Journal* 50: 227 - 244.
WOLFSON, L.M.; SUMNER, S.A., 1993. *Journal of Food Protection*, 56, 887-892.
ZAPICO, P.; GAYA, P.; DE PAZ, M.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M., 1991. *Journal of Dairy Science*, 74, 783-787.