

29



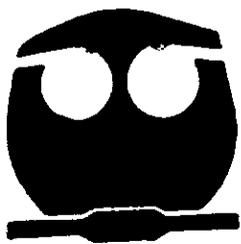
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CARACTERIZACION DE LA LACTOPEROXIDASA DE LA LECHE Y MEDICION DE SU ACTIVIDAD EN PRODUCTOS LACTEOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICA DE ALIMENTOS PRESENTA: BACILIZA QUINTERO SALAZAR



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES FAC. DE QUIMICA

1998.

TESIS CON FALTA DE ORIGEN

266403



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

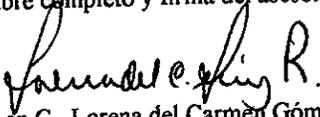
Jurado asignado:

Presidente	Prof. AGUILAR CABALLERO RAUL
Vocal	Prof. NIETO VILLALOBOS ZOILA
Secretario	Prof. GOMEZ RUIZ LORENA DEL CARMEN
1er. Suplente	Prof. BAEZ FERNANDEZ MARCOS FRANCISCO
2do. Suplente	Prof. FARRES GONZALEZ SARAVIA AMELIA MA. DE GPE.

Sitio donde se desarrolló el tema:

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA DIVISIÓN DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA-IZTAPALAPA

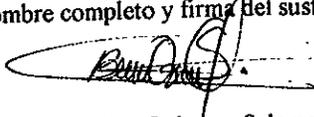
Nombre completo y firma del asesor del tema


M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz

Nombre completo y firma del supervisor técnico


M. en C. Mariano García Garibay

Nombre completo y firma del sustentante.


Baciliza Quintero Salazar

AGRADECIMIENTOS

A Dios por proporcionarme los medios necesarios para alcanzar mis metas.

A mis padres Luisa y Kefrén por su cariño, comprensión, por apoyarme siempre y por enseñarme con su diario ejemplo que el trabajo engrandece y hace feliz al hombre.

A Lore y Mariano por confiar en mi.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme permitido ser parte de ella.

A la Universidad Autónoma Metropolitana permitirme llevar acabo la realización de este trabajo en sus instalaciones.

DEDICATORIAS

A mis queridos hermanos: Male, Lety y Toño por ser parte de mí.

A America, Gera y Susy por su amistad incondicional y por compartir conmigo mis éxitos y fracasos a lo largo del duro camino recorrido para alcanzar esta meta tan importante.

A la gran familia Quintero.

A Tavo por ser un excelente compañero pero sobre todo por ser un gran amigo, el mejor.

A Ale y Estela por brindarme su valiosa amistad.

A Julio por esa amistad que empieza y que espero sea muy duradera.

A mis compañeros de "La Escuelita": Adriana, Andrés, Carlos, Cristina, Edgar, Gina, Hugo, Graciela, Misael, Perla, Pina, Rocío, Tere y Yadira por los grandes momentos que, aunque fueron pocos, los llevo muy presentes.

A mis compañeros de la Planta Piloto 2: Cris, Gaby, Jose Luis, Judith, Julie, Lulú, Paty, Pepe y Talina por su amistad y por haber colaborado de alguna manera en la realización de esta meta.

*Ustedes me dicen, entonces, que tengo que perecer
como también las flores que cultivé perecerán.*

*¿ De mi nombre nada quedará,
nadie mi fama recordará?*

Pero los jardines que planté, son jóvenes y crecerán...

Las canciones que canté, ¡cantándose seguirán!

Huexotzincatzin
Príncipe de Texcoco, 1484

ÍNDICE

Contenido	Página
1. Resumen	3
2. Introducción	4
3. Antecedentes	5
3.1. Leche	5
3.1.1. Definición	5
3.1.2. Composición química	5
3.1.3. Enzimas de la leche	6
3.1.4. <i>Minerales de la leche</i>	10
3.2. Sistema Lactoperoxidasa (SLP)	
3.2.1. Antecedentes	11
3.2.2. Componentes del Sistema lactoperoxidasa	12
3.2.3. Activación del Sistema lactoperoxidasa	14
3.2.4. Modo de acción del SLP	14
3.2.5. Efectos generales sobre las bacterias	15
3.3. Lactoperoxidasa	16
3.3.1. Definición	16
3.3.2. Distribución	16
3.3.3. Estructura química	17
3.3.4. Purificación y análisis.	17
3.3.5. <i>Factores que afectan la estabilidad de la lactoperoxidasa.</i>	18
3.3.5.1. Efecto del pH	18
3.3.5.2. Efecto de la temperatura	19
3.3.5.3. Efecto de la concentración de iones	21
3.3.6. Importancia y aplicaciones de la lactoperoxidasa	21
3.4. Métodos empleados para la conservación de la leche	22
3.4.1. Pasteurización	22
3.4.2. Empleo de microondas	24
3.4.3. Ultrapasteurización	24
3.4.4. Deshidratación	25
3.4.4.1. Leche en polvo	25
3.4.4.2. <i>Leche evaporada</i>	26

3.4.5. Fermentación (Yogurt)	27
3.4.5.1. Definición y propiedades	27
3.4.6. Empleo del Sistema Lactoperoxidasa	29
3.5. Cambios ocasionados por el calentamiento de la leche	31
4. Objetivos	34
4.1. Objetivo General	34
4.2. Objetivos Particulares	34
5. Metodología	35
5.1. Determinación de la actividad de la lactoperoxidasa	35
5.2. Determinación del efecto de la temperatura sobre la actividad de lactoperoxidasa en leche	36
5.3 Estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad de la lactoperoxidasa en suero	36
5.4. Determinación del efecto del tratamiento térmico de la leche sobre la actividad de la lactoperoxidasa.	36
5.5. Determinación del efecto del calcio	37
5.6. Determinación de la actividad de la lactoperoxidasa en productos lácteos comerciales.	38
6. Resultados y discusiones	39
6.1. Efecto de la temperatura sobre la actividad de lactoperoxidasa en leche	39
6.1.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la lactoperoxidasa en suero	45
6.2. Efecto del tratamiento térmico de la leche sobre la actividad de lactoperoxidasa en leche	48
6.2.1. Determinación de D y Z	53
6.3. Efecto de la concentración de calcio sobre la actividad de lactoperoxidasa.	56
6.4. Medición de la actividad de lactoperoxidasa en productos lácteos	58
7. Conclusiones	60
8. Bibliografía	61

FALTAN PAGINAS

De la: 1

A la: 2

1. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue hacer una caracterización térmica de la lactoperoxidasa en la leche y determinar la actividad en productos lácteos sometidos a diferentes tratamientos térmicos. En primer término se estudió el efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima tanto en leche como en suero, encontrándose que la temperatura óptima de la enzima está alrededor de 50°C, tanto en suero como en leche. Por su parte, las energías de activación de la reacción enzimática en suero y leche fueron 8178.78 cal/mol y 7041.87 cal/mol respectivamente, en tanto que los valores de las energías de activación para la desnaturalización fueron 58174.38 cal/mol en leche y 54592.56 cal/mol en suero.

También se estudió el efecto del calentamiento sobre la actividad de la enzima en la leche, encontrándose que ésta es muy estable a la temperatura cuando los tratamientos aplicados son menores de 70°C. Así mismo, se encontró que la lactoperoxidasa comenzó a ser sensible a pequeños cambios en la temperatura a partir de los 70°C. Por otra parte, se determinó que el valor de Z fue 3.3°C para un intervalo de temperaturas entre 68°C y 70°C; dicho valor coincidió con lo reportado por Barrett y col.(1998).

El efecto de la concentración de calcio sobre actividad de la lactoperoxidasa también fue estudiado, y no se observó un efecto significativo de dicho catión sobre la actividad de la enzima.

En cuanto a los productos lácteos analizados, se encontró actividad de lactoperoxidasa en las leches pasteurizadas y en las leches reconstituidas, aunque la actividad presente en estas últimas fue mucho menor que en el caso de las leches pasteurizadas. Por otra parte, en leches ultrapasteurizadas, leches en polvo y en yogures no se encontró actividad de esta enzima.

2. INTRODUCCIÓN

La lactoperoxidasa es la enzima más abundante en la leche. Biológicamente, es importante, ya que junto con el tiocianato y el peróxido de hidrógeno, integran el sistema antimicrobiano natural presente en leche, conocido como *sistema lactoperoxidasa (SLP)*. En dicho sistema, la lactoperoxidasa cataliza la oxidación del tiocianato en presencia de peróxido de hidrógeno, a hipotiocianito principalmente, el cual es un agente antimicrobiano para microorganismos patógenos, tales como: *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.

El SLP contribuye al mantenimiento de la calidad de la leche bronca de manera natural. Así mismo, existen evidencias que sugieren que tal vez se encuentre activo en otros productos lácteos, tales como la leche pasteurizada, ya que se ha observado al emplear sistemas de alta temperatura y tiempos cortos (HTST), se obtiene una leche que mantiene mejor calidad que aquella que ha sido tratada a 80°C. La explicación a este fenómeno podría estar relacionado con el SLP ya que a 72°C 15s la lactoperoxidasa sólo es parcialmente destruida, en tanto que a 80°C es inactivada.

La lactoperoxidasa no sólo es importante por su actividad biológica, tecnológicamente se emplea como un índice de calidad de los tratamientos térmicos aplicados a la leche. Por todo lo anterior, el estudio de las características térmicas de la lactoperoxidasa es muy importante, sin embargo, en la literatura son pocos los estudios acerca de dicho tema, y más escasos aún son aquellos que profundizan en las características térmicas, y por si fuera poco, hay variabilidad entre los distintos autores.

El objetivo de este trabajo fue hacer una caracterización térmica amplia de la lactoperoxidasa en la leche. Y dado que al parecer, la enzima tiene un sitio de alta afinidad para el calcio, se estudió el efecto de la concentración de dicho catión sobre la actividad de la lactoperoxidasa a varias temperaturas. Finalmente, se midió la actividad de lactoperoxidasa en productos lácteos comerciales, para tener una idea general acerca de los tratamientos térmicos aplicados durante su elaboración.

3. ANTECEDENTES

3.1 Leche

3.1.1 Definición

Desde el punto de vista biológico, la leche es una secreción de las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos (Santos Moreno, 1992), cuya función natural y principal es la de ser el alimento de los mamíferos jóvenes después del nacimiento, cuando el desarrollo es rápido y no puede ser sustituida por otros alimentos, ya que además, proporciona protección inmunológica (Alais, 1991).

Desde el punto de vista fisicoquímico, la leche es un sistema coloidal constituido por una solución acuosa de lactosa (5%), sales (0.7%), y muchos otros elementos en estado de disolución, en donde se encuentran las proteínas (3.2%) en estado de suspensión y materia grasa en estado de emulsión (Riel, 1991).

3.1.2 Composición química

La composición química de la leche no es constante, puede variar con factores tales como la especie, la raza, el ciclo de lactación, edad de la vaca, época del año, alimentación, el clima, temperatura, ordeño y ambiente (Santos Moreno, 1992; Riel, 1991).

La leche es un alimento que está constituido mayoritariamente por agua, grasas, proteínas, azúcares y minerales, también existen otras sustancias presentes en pequeñas concentraciones, tal es el caso de las enzimas, anticuerpos, hormonas y vitaminas. En la tabla 3.1, se muestran los valores promedio de los constituyentes de la leche.

En cuanto a proteínas se refiere, las más abundantes son las caseínas ya que representan el 78% del total, el resto está integrado por la beta-lactoglobulina, alfa-lactoalbúmina y otras (Santos Moreno, 1992).

La leche también contiene la lactosa. Este azúcar es el componente más lábil frente a la acción microbiana, ya que bacterias de distintos tipos pueden transformar a la lactosa en ácido láctico y en otros ácidos alifáticos (Alais, 1991).

Tabla 3.1. Composición general de la leche

Componentes mayoritarios		
I	Agua	86.69%
II	Materias grasas	3.9%
III	Proteínas y sustancias nitrogenadas no proteicas	3.2%
IV	Carbohidratos	5.1%
V	Sales	0.9%
Componentes minoritarios		
VI	Enzimas	
VII	Vitaminas	
VIII	Pigmentos (carotenos, xantofilas, riboflavina)	
IX	Células diversas (células epiteliales, bacterias y levaduras).	
X	Otros elementos (CO ₂ , O ₂ , N ₂ , y otros gases) Sustancias extrañas	

Fuente: Riel, 1991.

3.1.3 Enzimas de la leche

Las enzimas son biocatalizadores secretados por las células vivas. Químicamente, son proteínas con puntos isoeléctricos característicos y con diferente vulnerabilidad frente a agentes desnaturizantes tales como: calor, sales, alcohol, etc. Presentan propiedades específicas para catalizar determinadas reacciones de descomposición, de síntesis o de transformación. Cada una de estas tiene una temperatura y un pH óptimo a la cual alcanzan una actividad máxima (Riel, 1991).

En la leche se ha demostrado la presencia de numerosas enzimas, las cuales podrían ser excretadas por los tejidos mamarios y liberados con los demás componentes sintetizados

en la glándula, excretadas por microorganismos comunes en leche o deberse a la presencia de leucocitos y organelos de las células (Santos Moreno, 1992).

Las enzimas no están distribuidas homogéneamente en la leche. Muchas se encuentran principalmente en el suero, tal es el caso de la catalasa, lactoperoxidasa, ribonucleasa, γ -glutamilttransferasa, N-acetil- β -D-glucosaminidasa, α -manosidasa, etc. Otras se encuentran asociadas a la micela de caseína, por ejemplo: proteasas y lipasas. Por su parte xantin oxidasa, se halla principalmente en la fase grasa (Andrews, 1991).

Muchas de las enzimas de la leche son importantes desde el punto de vista tecnológico, por ejemplo: la lipasa, fosfatasa alcalina y la lactoperoxidasa. Otras, como en el caso de la lisozima, lactoferrina y nuevamente la lactoperoxidasa resultan interesantes por su actividad bactericida (Alais, 1991).

En la tabla 3.2, se muestran las enzimas que tienen actividad biológica importante en la leche

Tabla 3.2 Enzimas con actividad biológica en la leche

Enzima	Acción
Proteinasa (Plasmina, trombina, catespina D).	Defectos en textura y estabilidad en leche y productos lácteos
Lipasa	Producción de sabores desagradables y rancidez
Fosfatasa alcalina	Índice de pasteurización
Fosfatasa ácida	
Lactosa sintetasa	Biosíntesis de lactosa
γ -Glutamilttranspeptidasa	Participa en la síntesis de proteínas
Superóxido dismutasa	Antioxidante, inhibidor de radicales libres
Xantin oxidasa	Pro-oxidación
Catalasa	Pro-oxidante
Lactoperoxidasa	Diagnóstico de mastitis Agente antibacterial Pro-oxidación
N-acetilglucosaminidasa	Diagnóstico de mastitis
Lisozima	Agente antibacterial
Ribonucleasa	
Leucin aminopeptidasa	
Rodanasa	
Sulfhidril oxidasa	Reducción de sabores a cocido

Fuente: Andrews, 1991

De todas las enzimas mostradas en la tabla anterior, las más importantes tanto tecnológica como biológicamente son las siguientes:

Lipasas

Son enzimas que hidrolizan triglicéridos de las lipoproteínas (Olivecrona y Bengtsson-Olivecrona, 1991). Pueden desencadenar su actividad lipolítica en la leche con tratamientos como la agitación y la homogeneización. Su actividad depende del ciclo de lactación. Alcanzan máxima actividad a pH 8,5. Se destruyen con la pasteurización. Son sensibles a los rayos UV, cobre y enzimas proteolíticas (Santos Moreno, 1992; Riel, 1991).

Fosfatasas

Son enzimas que catalizan la hidrólisis de los ésteres glicerofosfóricos. En leche hay dos fosfatasas: una ácida que alcanza un máximo de velocidad a pH 4.75 y otra alcalina con un pH óptimo de 9. Esta última es muy importante desde el punto de vista tecnológico por su sensibilidad al calor: se inactiva con un tratamiento térmico de 62°C durante 15-20 minutos o 72°C 15-20s. Gracias a esta característica, esta enzima es ampliamente usada en el control en la pasteurización, ya que los tiempos de desnaturalización de dicha enzima, coinciden con los tiempos de destrucción de *Micobacterium tuberculosis* (Alais, 1991; Santos Moreno, 1992)

Proteasas

Son enzimas que hidrolizan las proteínas en péptidos más simples. Estos péptidos pueden afectar las propiedades físicas y reológicas. Además, pueden actuar sobre las proteínas de la membrana del glóbulo graso, permitiendo que las lipasas actúen sobre los lípidos y generando con ello sabores a rancio por la lipólisis. Una de las proteasas más importantes es la proteasa alcalina de la leche, que hidroliza a las proteínas (principalmente a β o κ -caseína) y libera proteínas de menor peso molecular como las caseínas γ . Esta enzima se inhibe con algunos metales tales como el cobre, zinc, mercurio, el inhibidor de la tripsina, clorometilcetona y parcialmente por magnesio, calcio, EDTA, o iodoacetato (Fox, 1991; Riel, 1991).

Cuando la proteasa alcalina actúa sobre las proteínas de la leche se dan ciertos cambios que pueden observarse en la leche, el queso o las soluciones de caseína que pueden ser de gran importancia en la industria de los productos lácteos. Por ejemplo, en leche ultra pasteurizada (UHT) se da un aumento de la viscosidad durante el almacenamiento. Además, las propiedades necesarias para la quesería tales como tiempo de coagulación, fuerza de la cuajada y sinéresis de la cuajada, se van deteriorando probablemente por la actividad de la proteasa alcalina (Fox, 1991).

La proteasa alcalina es una enzima con una alta resistencia térmica, razón por la cual representa problemas en la industria de las leches UHT, y solamente es destruida al aplicar un calentamiento a la leche de 142°C durante 18s (Riel, 1991; Fox, 1991).

Xantín oxidasa

Es una metaloproteína que contiene hierro y molibdeno. Está asociada a los glóbulos de grasa de la leche. Alcanza una actividad máxima a un pH entre 6-9, y se inactiva por un tratamiento térmico de 72°C durante 20 minutos (Riel, 1991).

Amilasas

Son enzimas capaces de hidrolizar el almidón en dextrinas. En leche se encuentran la α y β -amilasa. Se cree que probablemente son de origen sanguíneo, este hecho es importante porque la cantidad presente de esta enzima depende del estado patológico de la vaca. Se ha visto que la cantidad de esta enzima en calostro y en leches mastíticas es elevada mientras que en leches viejas disminuye. Estas enzimas se inactivan con un tratamiento térmico a 65°C por 30s. (Santos Moreno, 1992; Alais, 1991).

Catalasa

Enzima que descompone el peróxido de hidrogeno en oxígeno molecular y agua. La leche normal contiene solo una pequeña cantidad. Sin embargo, la actividad de esta enzima se incrementa cuando hay un aumento en la cantidad de leucocitos o bacterias, por lo tanto, su cuantificación se ha propuesto como un método para la identificación de leches mastíticas y calostro. La actividad de catalasa es máxima a pH 7 y destruye con calentamiento 65°C, 30 minutos (Alais, 1991; Santos Moreno, 1992).

Lisozima

Enzima que cataliza la ruptura del enlace entre el ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina, de la pared celular de las bacterias gram negativas, provocando por ello su destrucción. Tiene actividad bactericida contra numerosas bacterias. También libera en el intestino azúcares aminados, los cuales funcionan como factores de crecimiento para *Bifidobacterium sp.*, microorganismo que forma parte de la flora intestinal de los recién nacidos y al cual se le atribuyen importantes ventajas como probiótico aún en personas adultas (Reiter, 1978; Alis, 1991; Riel, 1991).

Lactoperoxidasa

Fue la primer enzima que se encontró en la leche, y es la más abundante este alimento; se encuentra en una concentración de 30mg/L. Su pH óptimo es de 6.8. Es una ferroproteína. Su detección es la base de la prueba de Storen para detectar leches que han sido sometidas calentamientos que han sobrepasado los 80°C y también para comprobar la presencia de peróxido en la leche. Forma parte del sistema lactoperoxidasa (Riel, 1991).

3.1.4 Minerales de la leche

La leche contiene una gran variedad de sales minerales, las cuales se encuentran en una proporción que varía de 3 a 10g por litro de leche (Alais, 1991). Los principales minerales presentes en leche son el calcio, potasio, magnesio y sodio. Estos se encuentran en su mayoría en forma de sales solubles, y se encuentran formando sales con los elementos ácidos: proteínas, ácido cítrico, fosfatos y cloro. En el caso de los fosfatos y citratos de calcio y magnesio, se encuentran en forma coloidal asociada a las caseínas (Riel, 1991) (Tabla 3.3).

La estabilidad de las proteínas de la leche depende en gran parte del equilibrio iónico de la leche. Este efecto se debe principalmente a los elementos polivalentes: calcio magnesio, fosfatos y citratos (Riel, 1991).

La concentración de calcio soluble en leche está relacionada con la concentración de citrato soluble, ya que este último existe formando un complejo con el calcio. La mitad

del fosfato inorgánico existe como un coloide de fosfato de calcio y solamente una pequeña cantidad (6.6%) del calcio total, está en forma soluble como ión Ca^{2-} (Varman y Sutherland, 1994).

Tabla 3.3 Distribución de minerales de la leche entre la fase coloidal y la fase soluble en porcentajes.

Minerales	Fase soluble	Fase coloidal
Calcio total	33	67
Calcio (ionizado)	100	0
Cloruros	100	0
Citratos	94	6
Magnesio	67	33
Fósforo total	45	55
Fósforo inorgánico	54	46
Potasio	93	7
Sodio	94	6

Fuente: Varman y Sutherland, 1994

3.2 Sistema Lactoperoxidasa (SLP)

3.2.1 Antecedentes

En 1924, Hansen, observó que la leche fresca tenía un efecto bactericida en contra de cierto tipo de bacterias y atribuyó este efecto a la presencia de enzimas oxidantes. Por su parte Wright y Tramer en 1959 establecieron que la lactoperoxidasa estaba involucrada en la inhibición de ciertos cultivos iniciadores en leche. Jago y Morrison en 1962 demostraron que es necesaria la presencia de peróxido de hidrógeno, para poder observar un efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano. Reiter y col. en 1964, demostraron que el donador de hidrógenos involucrado era el ión tiocianato (SCN^-). En 1977, Hoogendoorn y col. y Thomas concluyeron que el hipotiocianito (OSCN^-) era el agente antibacterial formado por la oxidación (catalizada por la lactoperoxidasa) del tiocianato. En 1980 Björck y Claesson

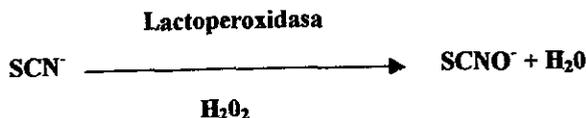
demonstraron que el hipotiocianito generado enzimáticamente no tenía el mismo efecto antibacterial que una mezcla óptima de lactoperoxidasa, SCN^- y H_2O_2 . Finalmente, en 1982 Pruitt y col. con base en estudios polarográficos de la oxidación de productos, concluyen que los oxiácidos mayores del tiocianato también están involucrados en el efecto antibacterial (Bjorck, 1992; Reiter y Harnulv 1984).

3.2.2 Componentes del sistema lactoperoxidasa

El sistema lactoperoxidasa está básicamente integrado por tres elementos: lactoperoxidasa, tiocianato y peróxido de hidrógeno.

Lactoperoxidasa

Es una enzima que se encuentra en forma natural en la leche de vaca. Cataliza la oxidación del tiocianato por el peróxido de hidrógeno en hipotiocianito mediante la siguiente reacción global:



Tiocianato

El anión tiocianato (SCN^-) está ampliamente distribuido en tejidos y secreciones de animales (Reiter y Harnulv, 1984). En leche se han registrado valores de 0.02 y 0.15 mM, dichas cantidades pueden variar dependiendo del tipo de alimentación del animal.

Las fuentes principales de tiocianato son: los glucosinolatos y los glucósidos cianogénicos. Estos compuestos se encuentran principalmente en vegetales del género *Brassica* (familia *Cruciferae*), tales como col, coliflor, nabo, etc., estos vegetales son ricos en glucosinolatos, los cuales por hidrólisis liberan al tiocianato y otros productos. Por su parte, los glucósidos cianogénicos se encuentran en las papas, maíz, caña de azúcar, yuca,

mijo, chicharos, frijoles, y en la semilla de varias frutas. Cuando los glucósidos son hidrolizados, generan cianuro, el cual reacciona con el tiosulfato (producto del metabolismo de los aminoácidos sulfurados) y entonces es destoxificado por conversión a SCN^- . La enzima que cataliza esta reacción es la rodanasa (Reiter y Härnolv, 1984; Wolfson y Sumner, 1993).

Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno es el tercer componente del sistema lactoperoxidasa. Generalmente se asume que la leche no contiene peróxido de hidrógeno. Aunque el tejido mamario es metabólicamente activo durante la lactación, el peróxido de hidrógeno formado es rápidamente reducido por la catalasa o la peroxidasa. Cuando estas enzimas son inactivadas con azida, es posible detectar concentraciones nanomolares de peróxido de hidrógeno generadas y esparcidas por los leucocitos polimorfonucleares cuando se suspenden en leche (Reiter y Härnolv, 1984). Otra posible fuente de peróxido en leche es el generado por la actividad metabólica de bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. Estas bacterias, pueden generar en condiciones aeróbicas cantidades suficientes de peróxido de hidrógeno para activar el sistema lactoperoxidasa (Reiter y Härnolv, 1984; Wolfson y Sumner, 1993). En algunas ocasiones, esto no es deseable ya que pueden inhibir a los cultivos iniciadores empleados en la elaboración de quesos y otros productos fermentados (Roginski y col., 1984; Limsowtin, 1992; Nichol y col., 1995; Moate y col., 1996).

El peróxido también puede adicionarse directamente a la leche o generarse en forma endógena mediante métodos químicos o enzimáticos tales como: la oxidación de ácido ascórbico (Wolfson y Sumner, 1993); empleando glucosa oxidasa o carbonato de sodio pentahidratado (Dionisyus y col., 1992) o empleando lactasa y glucosa oxidasa inmovilizadas (García-Garibay y col., 1995).

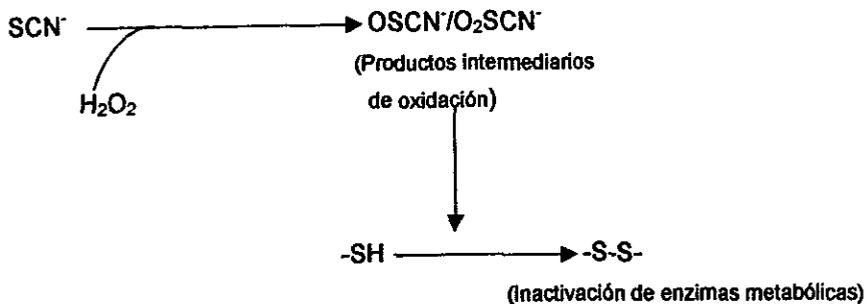
3.2.3 Activación del sistema lactoperoxidasa

Para que el efecto antibacterial del sistema lactoperoxidasa se manifieste en la leche, es de vital importancia que sus tres componentes: lactoperoxidasa, tiocianato y peróxido de hidrógeno se hallen en las concentraciones correctas. Björk (1978) observó que un efecto antibacterial óptimo se daba cuando se empleaban concentraciones equimolares de tiocianato y peróxido de hidrógeno.

También es importante que en el medio no halla sustancias tales como la cisteína y otros sulfhidrilos libres ya que estos inhiben al sistema (Beumer y col., 1985; Ekstrand y col., 1985).

3.2.4 Modo de acción del sistema lactoperoxidasa

La mayoría de los investigadores coinciden en que el principal producto intermediario de la oxidación del SCN^- es el hipotiocianito (Wolfson y Sumner, 1993). Esta sustancia inactiva a las enzimas de algunas bacterias mediante la siguiente reacción global:



Fuente: Limsowtin, 1992.

El OSCN^- , inhibe el crecimiento, absorción de oxígeno y producción de ácido láctico. Además, inhibe enzimas bacterianas incluyendo la hexocinasa y la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (Wolfson y Sumner, 1993), y por lo tanto un número de actividades metabólicas tales como la respiración y la glucólisis se ven

afectadas (Thomas y Aune, 1978).

La oxidación de grupos sulfhidrilo (-SH) de las enzimas y otras proteínas ha sido considerada como la posible clave para la acción del sistema lactoperoxidasa. Se ha observado que la membrana citoplásmica de las bacterias expuesta al SLP es dañada estructuralmente debido a la pérdida de iones K^+ , aminoácidos y polipéptidos dentro del medio. Subsecuentemente, el consumo de oxígeno, síntesis de purinas, pirimidinas, aminoácidos así también como la síntesis de RNA y DNA son inhibidas, produciendo finalmente lisis en la célula (Wolfoson y Sumner, 1993; Aguilar, 1990).

3.2.5 Efectos generales sobre las bacterias

Los diferentes grupos de bacterias muestran variación en el grado de resistencia ante el sistema lactoperoxidasa (Reiter y Härnulf, 1984). Por ejemplo, se ha visto que las bacterias que crecen anaeróbicamente parecen ser más susceptibles al SLP que los *microorganismos* aerobios (Wolfoson y Sumner, 1993). También se ha visto que el efecto del SLP en algunas bacterias gram positivas es bacteriostático, en tanto que en coliformes es bactericida (Reiter y Härnulf, 1984, Ridley y Shalo, 1990).

Existen varios reportes acerca de los mecanismos de resistencia al OSCN⁻. Estos incluyen a una enzima que cataliza la reducción de OSCN⁻ por el NADH y un incremento en la célula de los grupos sulfhidrilo que rápidamente reducen el OSCN⁻ a SCN⁻. Otra posibilidad incluye nuevos mecanismos de sistemas de respiración OSCN⁻ resistentes y un mecanismo de transporte de azúcar fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato, el cual es resistente al OSCN⁻ (Wolfoson y Sumner, 1993).

Mediante el mecanismo de acción mencionado, el sistema lactoperoxidasa inhibe a una gran variedad de bacterias gram negativas, tales como *Pseudomonas* (Björk y col., 1975), *Escherichia coli* y *Salmonella thyphimurium* (Ekstrand y col., 1985; Banks y Board, 1985). También ha demostrado que inhibe a *Staphylococcus aureus* (García-Garibay y col., 1995), *Listeria monocytogenes* (Denis y Ramet, 1989; Siragusa y Johnson, 1989; Earnshaw y Banks (1989), *Aeromonas hidrofila* (Santos y col., 1994); *Campilobacter jejuni* (Beumer y col., 1985) y microorganismos psicrótrofos y hongos (García-Garibay y col., 1995).

3.3 Lactoperoxidasa

3.3.1 Definición

Las peroxidasas están definidas como enzimas cuya función principal es la de oxidar moléculas a expensas del peróxido de hidrógeno (Reiter y Härnulf, 1984), mediante la siguiente reacción global:



Donde AH_2 y A son las formas reducida y oxidada respectivamente de un donador apropiado de electrones (Bjork, 1992).

3.3.2 Distribución

La lactoperoxidasa fue la primera enzima descubierta en la leche de vaca (Alais, 1991). Es una enzima que se halla en el suero principalmente (Chiu y Etzel, 1997) y está presente en la leche de muchas especies, por ejemplo: bovinos, porcinos, caprinos etc., y como es de suponerse, la cantidad presente en cada especie es diferente y varía además con el estado de lactación. En leche bovina hay aproximadamente 30 mg/L (Champagne y Goulet, 1991; Bjork, 1992) mientras que en la leche de las cerdas de guinea hay 20 veces más enzima que en la leche de vaca (Stephens y col., 1979).

La actividad de lactoperoxidasa también ha sido hallada en otras glándulas y secreciones humanas tales como saliva (Gotherfors y Marklund, 1975; Pruit y col., 1990), moco cervical (Shindler y Bardsley, 1976); moco nasal y en las lágrimas (Bjork, 1992).

Las peroxidasas de la leche de cabra y oveja así como la peroxidasa presente en la saliva humana son inmunológicamente similares a la lactoperoxidasa bovina. Sin embargo, se ha visto que pueden tener diferencias en algunas de sus características moleculares, catalíticas y cinéticas (De y Banerjee, 1992).

Se ha dicho que el término **lactoperoxidasa**, puede ser inapropiado cuando se aplica más allá del sistema leche, por ejemplo, el generalizar que todas las peroxidasa solubles de las glándulas ectodérmicas de mamíferos y sus secreciones son también lactoperoxidasas, sigue siendo inapropiado (De y Barneje, 1992). Sin embargo, en la literatura muchas veces se ha aplicado el término indistintamente.

3.3.3 Estructura química

La lactoperoxidasa es una hemoglicoproteína, con un peso molecular de 78 kDa (Bojork, 1992; De y Banerjee, 1992). Su estructura primaria es desconocida, sin embargo, la información acerca de su estructura secundaria indica que el 65% de la molécula son estructuras β , 23% existe como estructuras α y el 12% restante como estructuras no coordinadas. Además, está integrada por una sola cadena polipeptídica (Moldovenau y col., 1982) con 8 puentes disulfuro que contribuyen a la rigidez molecular (Bjork, 1992; Booth y col., 1989).

Por otra parte, es importante señalar que esta enzima tiene una alta afinidad por calcio, el cual podría tener un papel importante tanto en su estabilidad como en sus propiedades catalíticas (Booth y col., 1989).

3.3.4 Purificación y análisis de lactoperoxidasa

La purificación de lactoperoxidasa es muy laboriosa y además de muy bajo rendimiento ya que es preciso tratar a 100 L de leche para obtener 2 g de lactoperoxidasa cristalizada (Alais, 1991).

La lactoperoxidasa puede ser aislada a partir de suero de leche por intercambio catiónico (Bjork, 1992; Chiu y Etzel, 1997).

Tradicionalmente, la actividad de lactoperoxidasa se ha medido espectrofotométricamente usando un cromógeno como donador de electrones (Bjork, 1992). Originalmente se empleaban derivados de las bencidinas, por ejemplo: *o*-toluidina,

pero debido a su alta toxicidad ya no son usados. También se ha empleado guayacol (Pruitt y col., 1990), sin embargo, se ha visto que en las soluciones viejas de guayacol, se pueden generar varios productos de oxidación que pueden interferir en la reacción entre la lactoperoxidasa y el peróxido de hidrógeno (Mäkinen y Tenovu, 1982). Otra alternativa para medir la actividad, es el empleo de ácido- 6-sulfónico- 2,2' Azino-di-etilbenzotiazolina (ABTS) como cromógeno (Childs y Bardsley, 1975; Shindler y Bardsley, 1975; Pruitt y col., 1990). Este compuesto presenta muchas ventajas ya que es relativamente no tóxico y tiene una alta absorbancia en su forma oxidada (Bojork, 1992).

3.3.5 Factores que afectan la estabilidad de la lactoperoxidasa

Al igual que a todas las enzimas, la estabilidad de la lactoperoxidasa puede verse afectada principalmente por factores tales como: pH, temperatura y la presencia de iones.

3.3.5.1 Efecto del pH

La lactoperoxidasa es una enzima muy estable al pH, resiste *in vitro* un pH de 3. También se ha visto que es resistente al jugo gástrico (Wolfson y Sumner, 1993). En estudios realizados por Sato y col. (1992), demostraron que la enzima era estable en un rango de pH 4-9, pero que era totalmente desnaturalizada a pH 2, dependiendo del tiempo de incubación. Aunque la lactoperoxidasa fue estable a valores de pH mayores de 4, observaron que si recibía tratamiento térmico era estable solamente en un rango de pH entre 5.6-7.7. El pH óptimo es de 6.8 (Riel, 1991). En cuanto al punto isoeléctico De y Banerjee, (1992), reportan que está entre 8.5-9.3, en tanto que Chiu y Etzel (1997) lo establecen en un intervalo de 9.2-9.9.

3.3.5.2 Efecto de la temperatura sobre lactoperoxidasa

La lactoperoxidasa es una enzima estable al calentamiento, sin embargo, su actividad se reduce con el incremento de la temperatura y el tiempo de calentamiento (Sato y col , 1992).

Es importante señalar que existen estudios acerca de este efecto sobre la actividad de lactoperoxidasa, sin embargo, existen ciertas diferencias entre unos autores y otros, sobre todo en lo que se refiere a la temperatura exacta a la cual la enzima se inactiva y si la enzima es renaturalizada o no después de haber recibido un tratamiento térmico (Tabla 3 4). Sin embargo, casi todos los autores coinciden en que la enzima pierde gran parte de su actividad cuando se aplica un tratamiento entre 75 y 80°C. Tal característica es muy importante desde el punto de vista tecnológico, ya que ha sido empleada en la prueba de Storch para identificar las leches que han sido sometidas a un calentamiento que ha sobrepasado los 80°C (Riel, 1991).

Existen pocos estudios completos acerca de la termoestabilidad de lactoperoxidasa en leche Griffiths (1986), realizó un estudio sobre la termoestabilidad de varias enzimas de la leche, entre ellas la lactoperoxidasa, y encontró entre otras cosas que esta enzima era la mas adecuada para la detección de tratamientos térmicos en leche en el orden de 76°C por 15s. También observó que la enzima es virtualmente inactivada cuando se aplica un tratamiento térmico de 78°C, 15s independientemente de la actividad inicial (Griffiths, 1986).

Tabla 3.4. Comparación de los distintos resultados obtenidos sobre el efecto de la temperatura sobre la actividad de lactoperoxidasa.

AUTOR	OBSERVACION
Pien (1945)	Estableció se requería de un tratamiento de 80°C durante 3.5 min. para inactivar a la lactoperoxidasa
Hakey (1950)	Reportó que la peroxidasa bovina es inactivada cuando se calentaba 70°C 2horas, 72°C 20 minutos o 74°C 7 minutos.
Guha y Roy (1973)	El calentamiento de la leche a 60°C. 60 minutos no destruyó a la enzima. Sin embargo, ésta sí se destruyó cuando la temperatura de la leche se incrementó gradualmente hasta 80°C durante 3 minutos. También encontraron que en un tratamiento a 125°C durante 10-15 minutos, la regeneración de enzima no tuvo lugar.
Monget y Laviolette (1978)	Reportaron que la enzima era completamente desnaturalizada por el calentamiento a 80°C por 20s.
Shidlovskaya(1982)	Demostó que la lactoperoxidasa no era totalmente desnaturalizada con un tratamiento a 80°C. 20s.
Griffiths (1986)	Reporta que en el calentamiento a 80°C durante 15s. la actividad de lactoperoxidasa se redujo en un 40%
Kiermeier y Kayser (1960)	Establece que dependiendo de la temperatura de inactivación, una parte de la actividad de lactoperoxidasa puede ser restaurada después del almacenamiento.
Griffiths (1986)	Concluye que la enzima es virtualmente inactivada cuando se aplica un tratamiento térmico de 78°C, 15s independientemente de la actividad inicial. El almacenamiento a 4°C por 24h no restaura la actividad de leche que ha sido sometida previamente a tratamientos térmicos entre 65 y 80°C por 15s.
Alais (1991)	Cita que la actividad de lactoperoxidasa puede ser regenerada en leche que ha recibido un tratamiento UHT. Esta actividad se regenera poco a poco durante el almacenamiento, sin embargo, no llega a los niveles de actividad originales.
Sato y col.. (1992)	Aplicó tratamientos térmicos 65-80°C durante 10 minutos, y encontró que la actividad residual de la enzima era mayor, si estos tratamientos se hacían en presencia de cloruro de sodio 0.1M.

Fuentes: Guha y Roy, 1973; Griffiths, 1986 y Sato y col., 1992.

Existen algunos reportes respecto a la evaluación del efecto de la temperatura sobre la actividad de lactoperoxidasa en leche, determinando los parámetros D (tiempo necesario para que se destruya el 90% de la actividad de la enzima a una temperatura determinada) y Z (el número en grados centígrados necesario para cambiar el valor de D en un factor de 10) Griffiths (1986), reportó el valor de Z (5.4°C) que él obtuvo para un rango de temperaturas entre 65 y 80°C; él comparó dicho resultado con los valores de Z reportadas

en la literatura, encontrando una gran diferencia entre los valores obtenidos por otros autores. lo cual probablemente se debe a los diversos métodos y condiciones experimentales empleadas durante las determinaciones. Por su parte Barrett y col. (1998), estudiaron el efecto del calentamiento de la leche bronca empleando varias combinaciones de temperatura y tiempo, y encontraron que la lactoperoxidasa fue extremadamente sensible a pequeños cambios de temperatura por arriba de 67°C . y determinaron los valores de Z entre 2,8 y 3,5 (Tabla 3.5).

Tabla.3.5 Valores de Z para lactoperoxidasa

Autor	Intervalo de temperatura en el que trabajaron.	Valor Z ($^{\circ}\text{C}$)
Pien. 1945	74-83	8
Griffiths. 1986	65-80	5.4
Barrett y col., 1998	67-75	2.8-3.5

Fuente: Griffiths, 1986 y Barret y col., 1998.

3.3.5.3 Efecto de la concentración de iones

Se ha visto que existen algunos iones tales como el calcio y el sodio que contribuyen a la termoestabilidad de la enzima. Sato y col., (1992), encontraron que la enzima fue mucho más estable cuando el calentamiento se daba en presencia de cloruro de sodio 0.1M. También demostraron que la actividad residual máxima se daba en cloruro de calcio con una fuerza iónica de 0.03, cuando la lactoperoxidasa era calentada a 70°C por 30 minutos. El mismo fenómeno fue observado con magnesio. Estos autores también especularon que el mecanismo de termoestabilidad con cationes monovalentes podría ser diferente que con calcio. Más tarde esta hipótesis fue apoyada por Sciancalepore y col. (1996), quienes observaron que la termoestabilidad de la enzima estaba considerablemente influenciada por el tipo y la concentración del catión Así mismo establecieron que los cationes, calcio y magnesio tienen un efecto estabilizador más grande que el sodio y el potasio, a bajas concentraciones, pero éstos tenían el efecto contrario a altas concentraciones. Basados en estos resultados, establecieron que el mecanismo de

inactivación de la enzima con cationes monovalentes es diferente que con los cationes divalentes.

3.3.6 Importancia y aplicaciones

La aplicación tecnológica más importante de la lactoperoxidasa es la identificación de leches que han sido sometidas a un tratamiento térmico que ha sobrepasado los 80°C (Riel, 1991). Así mismo, es importante desde el punto de vista comercial, ya que proporciona beneficios médicos y nutricionales, y puede ser considerada como un "nutracéutico" (Horton, 1995; Chiu y Etzel, 1997), ya que, evidencias clínicas han demostrado que el cepillado de dientes con pasta suplementada en lactoperoxidasa reduce la caries dental (Chiu y Etzel, 1997). La lactoperoxidasa, como parte del SLP también puede emplearse como un método alternativo para la conservación de leche y de otros alimentos (Gould, 1996; Haddadin y col., 1996; DeWit y VanHooydonk, 1996).

3.4 Métodos empleados para la conservación de la leche y productos lácteos

El hombre siempre ha buscado la manera de conservar a sus alimentos por periodos considerables de tiempo. La leche no ha sido la excepción, es por ello que se han empleado diversos métodos para su transformación y conservación. Tales métodos incluyen la pasteurización, ultrapasteurización, fermentación y la elaboración de diversos productos derivados.

3.4.1 Pasteurización

Este tratamiento tiene como función disminuir mediante calor a la flora microbiana y la totalidad de la flora patógena, alterando lo menos posible la estructura física, el equilibrio químico, sustancias con actividad biológica, enzimas y vitaminas (Santos Moreno, 1991).

Las temperaturas y los tiempos aplicados en la pasteurización dependen de las normas de cada país. Por ejemplo, en Quebec, estas normas son de 62.8°C durante 30 minutos o de 72.8°C durante 16 segundos (Bonning y col., 1991), en tanto que en nuestro país, las condiciones establecidas son: 62.7°C 30 minutos o 72.2°C 15s. (Santos Moreno, 1991).

Es de suma importancia aplicar el tratamiento térmico adecuado, ya que de lo contrario, si por ejemplo, el tratamiento fuera menor de lo establecido, no se destruiría a *Micobacterium tuberculosis*, y entonces, no se lograría el objetivo de la pasteurización; por otra parte, si el tratamiento fuera mayor de lo establecido, se generarían sabores a cocido y además habría destrucción algunas vitaminas y entonces el valor nutritivo y sensorial de la leche no sería el mismo.

Aunque la pasteurización sea un tratamiento empleado para destruir gran parte de los microorganismos patógenos, es bien importante partir de leche de buena calidad.

Existen dos métodos de pasteurización de la leche: pasteurización discontinua o lenta, LTLT ("Low Temperature Long Time") pasteurización continua o alta HTST ("High Temperature Short Time").

a) Pasteurización lenta (LTLT)

Mediante este método, la leche se calienta a 62 7°C durante 30 minutos. Este método tiene la ventaja que pueden emplearse volúmenes pequeños, pero tiene la desventaja que no es muy higiénico ya que la leche no está aislada del medio durante el proceso (Santos Moreno, 1991).

b) Pasteurización Alta (HTST)

En este tratamiento la leche se calienta a 72.7°C. 15s. Este método es el más usado. Las ventajas de este método son: se pueden procesar grandes volúmenes, mejor

pasteurización, las bacterias termófilas no causan problemas durante el proceso, y dado que el sistema es cerrado, se impide la destrucción de la vitamina C. La desventaja sería que no se pueden procesar volúmenes pequeños (Santos Moreno, 1991).

3.4.2 Empleo de microondas como una alternativa para la conservación de la leche

El calentamiento empleando microondas puede ser un método alternativo para la preservación de alimentos. En el caso de la leche, cuando la energía de microondas es empleada, la leche es calentada rápida y directamente, sin la transferencia de calor de superficies, evitando de esta manera los gradientes de temperatura que prevalecen en los sistemas convencionales (López y col., 1996).

López y col. (1996), estudiaron el efecto del calentamiento de la leche con microondas, para ello, emplearon como índices de tratamiento térmico a la desnaturalización de la β -lactoglobulina y la inactivación tanto de la fosfatasa alcalina como de la lactoperoxidasa. Los resultados fueron comparados con los obtenidos empleando el método convencional de calentamiento. Observaron que la desnaturalización térmica de las enzimas con el tratamiento en microondas era menor que con el sistema convencional. Por lo tanto, concluyen que el empleo de microondas puede ser un sistema efectivo y alternativo para la pasteurización de la leche.

3.4.3 Ultrapasteurización (UHT)

En el tratamiento UHT, la leche es calentada en continuo a una temperatura mínima de 132°C durante algunos segundos, enfriada a temperatura ambiente y envasada asépticamente, todo esto con el objeto de (Bonnin y col., 1991):

- 1) Asegurar su estabilidad y su larga conservación para satisfacer las exigencias comerciales.
- 2) Eliminar a los microorganismos patógenos.
- 3) Destruir todos los microorganismos capaces de proliferar durante el

almacenamiento

El aplicar el tratamiento UHT ayuda a la conservación de la leche durante largos periodos de tiempo y sin necesidad de refrigeración. Sin embargo, también se produce la desnaturalización de la β -lactoalbumina, lo cual implica una liberación de grupos sulfhidrilo, y por lo tanto la generación de sabor a cocido en la leche recién tratada (Bonnin y col. 1991). Además, también causa un incremento en la viscosidad de la leche, sin embargo, este defecto disminuye durante los primeros días de almacenamiento (Hill, 1988).

3.4.4 Deshidratación

Mediante este método de conservación, se puede almacenar todo el extracto de leche en un volumen muy reducido y por consiguiente hay un ahorro en el transporte y almacenamiento (Blais y col, 1991).

3.4.4.1 Leche en polvo

La leche en polvo se clasifica de acuerdo a su composición en: leche en polvo entera o leche en polvo descremada; de acuerdo al método de desecación en: leche desecada en rodillos o leche en polvo obtenida por atomización, y de acuerdo a la intensidad del tratamiento térmico empleado durante la desecación en: leche en polvo de baja temperatura, de media temperatura y de alta temperatura. Estos tipos de leche se diferencian por el grado de desnaturalización de sus proteínas solubles, el cual aumenta proporcionalmente con la intensidad del tratamiento térmico (Blais y col, 1991).

Proceso de elaboración

En términos generales, primero se realizan operaciones previas al precalentamiento. En estas operaciones, primero se ajusta el contenido de grasa de la leche. Luego, viene la homogeneización, clarificación y filtración. Después viene el precalentamiento, éste paso es muy importante ya que determina muchas propiedades del producto final. Las

temperaturas empleadas en la industria son muy variables y se clasifican en: precalentamiento a baja, media temperatura y alta temperatura (Tabla 3.6). Después se realiza la concentración; esta operación puede realizarse por evaporación, por ultrafiltración o por ósmosis inversa. El siguiente paso es la desecación y consiste en pulverizar la leche en forma de gotitas. El último paso es el envasado, que puede hacerse en envases de plástico, cartón o metal (Blais y col, 1991).

Tabla 3.6 Tipos de precalentamientos aplicados en la elaboración de leche en polvo.

Precalentamiento	Tratamiento térmico	Características
Temperatura baja	Equivalente a pasteurización normal	Contenido mínimo de proteínas del suero no desnaturalizadas 6mg/g
Temperatura media	76.5°C-85°C, 15-30 min.	Se producen grupos reductores y aumenta la capacidad de conservación. Contiene 1.5-6mg de proteínas séricas no desnaturalizadas/g leche en polvo desnatada.
Temperatura alta	90°C-110°C, y en ocasiones 121°C, hasta 1s	Contiene menos de 1.15mg de proteínas del suero no desnaturalizada /g de leche desnatada en polvo.

Fuente: Blais y col, 1991.

Transformar la leche fluida en leche en polvo tiene muchas ventajas, sin embargo, éstas leches pueden presentar ciertos defectos entre los que destacan: acidez, presencia de sedimentos, alta humedad, defectos de solubilidad, rancidez, oxidación, y recuento microbiano alto (Blais y col. 1991).

3.4.4.1 Leche evaporada

La leche evaporada es el producto que se obtiene concentrando la leche por el calor y después esterilándola en recipientes herméticos (Blais y col., 1991).

Proceso de elaboración

El primer paso para la elaboración de leche evaporada consiste en hacer un pre-ajuste de la relación materia grasa/extracto seco magro de la leche para obtener la deseada en el producto final. Después se realiza un primer precalentamiento hasta una temperatura de 85°C-90°C durante 15-20 minutos, para luego continuar con un segundo precalentamiento corto el cual se realiza por arriba de 100°C. El siguiente paso es la concentración, la cual se puede realizar empleando evaporadores de placas o empleando ósmosis inversa. Una vez concentrada la leche, ésta recibe un tratamiento de homogenización con el fin de conseguir que la emulsión grasa se mantenga estable durante el almacenamiento. Después la leche se refrigera para evitar contaminación microbiana y se almacena en tanques aislados; en este momento se efectúa el ajuste final de la relación materia grasa/extracto seco magro, el enriquecimiento de la leche con vitaminas C y D, y si es necesario, se añaden sales estabilizantes. Luego viene el envasado en botes metálicos y finalmente, la esterilización a 115°C durante 20 minutos; 120°C 10 minutos, o bien 124°C durante 6 minutos (Blais y col. 1991).

En cuanto a los defectos que se presentan más frecuentemente en las leches evaporadas son: alteraciones bacterianas, coagulación dulce, separación de la materia grasa, defectos en el color, viscosidad, etc. (Blais y col. 1991).

3.4.5 Fermentación (Yogurt)

Otra alternativa para la conservación de la leche durante largos periodos es mediante la fermentación. Como resultado de esta forma de conservación se obtienen productos con características sensoriales aceptables y además nutritivos. En este trabajo, solo hablaremos del yogurt

3.4.5.1 Definición y propiedades

De acuerdo con la definición de Kosikowsky, el yogurt es un producto lácteo fermentado que resulta del crecimiento de las bacterias *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en leche tibia, y se caracteriza por tener una textura suave y delicada con un característico sabor a nogal (García-Garibay, 1986).

El yogurt como alimento, presenta numerosos beneficios para quienes lo consumen. Metchnikoff sugirió que los microorganismos del yogurt tienen una acción benéfica sobre la flora intestinal, sin embargo, hay dudas acerca de su supervivencia y acción en el tracto intestinal. Por otra parte, también se ha encontrado que *L. bulgaricus*, puede sintetizar sustancias con actividad antitumoral. También se sabe que las propiedades inmunoestimulantes del yogurt, no están ligadas a la viabilidad de las células ya que se encuentran también en cultivos inactivados por calor (Goulet, 1991).

Al yogurt también se le atribuyen efectos terapéuticos: ha sido usado contra desórdenes estomacales, gastroenteritis y constipación. También se ha visto que tiene un efecto hipocolesterolemico gracias al hidroximetil glutarato, el cual inhibe la síntesis de colesterol. Finalmente, el yogurt es un producto nutritivo ya que tanto las proteínas como los carbohidratos presentes en él, son más digeribles que en la leche (Deeth y Tamine, 1981).

Proceso de elaboración

Partiendo de leche clarificada, y parcialmente descremada, el primer paso de la elaboración del yogurt es la pasteurización. El objetivo de este tratamiento es mejorar la calidad higiénica de la leche, eliminando bacterias para tener el medio adecuado para el cultivo de los iniciadores, libre de competidores y microorganismos indeseables. Otro de los objetivos que se pretende al pasteurizar es desnaturalizar las proteínas, lo cual favorece el crecimiento de *L. bulgaricus*. Además, también se favorece la agregación de las proteínas y la asociación de la kapa-caseína con la beta-lactoalbumina. La pasteurización, se realiza a una temperatura que va de 70 a 90°C, de 5 a 45 minutos en procesos continuos en intercambiadores de calor tubulares o de placas (García-Garibay, 1986).

La leche que se va a emplear, puede ser homogeneizada ya sea antes o después de la pasteurización. Esta operación se realiza a 60°C y presiones de 2 6 a 6 8 Kpa.

Después de la homogeneización o pasteurización, la leche se deja enfriar hasta 42-45°C y entonces se inocula con 2 a 5% de una mezcla 1:1 de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*. La leche se incuba de 3 a 6 horas hasta alcanzar un pH cercano a 4.4. Una vez obtenido el yogurt, lo que sigue es almacenarlo máximo a 5°C (García Garibay, 1986).

3.4.6 Empleo del sistema lactoperoxidasa (SLP)

El SLP, es un sistema antimicrobiano natural, que no representa riesgos toxicológicos para los humanos, tan es así que organismos internacionales tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Federación Internacional de Lácteos (IFD), han recomendado su uso en algunas circunstancias, por ejemplo, en países en desarrollo para evitar pérdidas debidas a las condiciones higiénicas por debajo de lo recomendable, altas temperaturas climáticas y falta de refrigeración (García-Garibay y col., 1995; Sarkar y Misra, 1994). Sin embargo, existen países (como el nuestro) que no permiten la adición de peróxido para activar al sistema. Pese a lo anterior, hay estudios que proponen la activación del SLP como una alternativa para la conservación de leche y de otros alimentos (Gould, 1996; Haddadin y col., 1996; DeWit y VanHooydonk, 1996). En la tabla 3.7 se resumen las investigaciones acerca de la aplicación del SLP en la conservación de la leche.

La activación del sistema lactoperoxidasa en leche que posteriormente se emplea para la elaboración yogurt ya ha sido estudiada. Aguilar Muslera (1990) observó que el emplear leche estabilizada mediante el SLP para la elaboración de yogurt, reducía significativamente el desarrollo de la acidez y la actividad lipolítica. Años más tarde, Nakada y col. (1996), observaron que la adición de lactoperoxidasa al yogurt suprimía la producción de ácido, y Hirano y col. (1998) demostraron que la viscosidad aparente de yogurt disminuía con la adición de lactoperoxidasa.

Tabla 3.7. Estudios del sistema lactoperoxidasa en alimentos.

Autor	Observaciones
Bjork, 1978	Encontró que la activación del SLP en leche reduce y previene la multiplicación de bacterias psicrotróficas por arriba de 5 días. La activación SLP no afectó las propiedades fisicoquímicas de la leche y tampoco permitió la acumulación de bacterias resistentes.
Zajac y col., 1983	Demostraron que a 4°C la cuenta en placa en leche activada con SLP permanecía sin cambio al menos durante 104 horas, mientras que la multiplicación bacterial en los controles empezaron después de 48h. Sugirieron que la activación del SLP en combinación con un método de enfriamiento moderado, podría ser un uso alternativo para mantener la calidad de la leche bronca en almacenamiento.
Banks y Board, 1985	Demostraron que <i>Enterococcus</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> y <i>Enterobacteriaceae</i> no crecieron en una fórmula infantil que se inoculó con la flora mezclada contenida en agua de lago y suplementada con SLP. La activación del SLP previno significativamente la utilización de glucosa y estabilización del pH.
Martínez y col., 1988	Proponen la activación del SLP es necesaria para extender la vida de anaquel de la leche pasteurizada cuando la leche bronca ha sido almacenada por más de dos días.
Denis y Ramet, 1989	La eficiencia del sistema lactoperoxidasa es dependiente de la temperatura. Sugieren que el SLP puede ser efectivo en productos lácteos como un factor de seguridad para ayudar en la inhibición de <i>L. monocytogenes</i> .
Ridley y Shalo, 1990	Ellos establecen que la activación del SLP en combinación con un método simple de evaporación fresca puede ser efectiva para extender la vida de anaquel de la leche bronca por más de 22h.
Kamau y col., 1991	Demuestra que la activación del SLP anterior a la pasteurización mejora significativamente la destrucción térmica de <i>L. monocytogenes</i> , y <i>S. aureus</i> en leche durante su pasteurización, y por lo tanto ayuda a extender la vida de anaquel de la leche tratada de esa manera.
Ravanis y Lewis, 1995	Almacenaron la leche bronca por 14 días a 4°C, esta leche fue pasteurizada los días 1,3,4,7,9, y 14. Encontraron que todas las leches pasteurizadas mantenían su calidad hasta por 22 días y en algunos casos hasta por 42 días. La mejor calidad se encontró en la leche que fue pasteurizada en los días 3 y 4, lo cual pudiera deberse a que en estos días el SLP está más activo.

3.5 Cambios ocasionados por el calentamiento de la leche

El calentamiento de la leche es un tratamiento ampliamente usado en la industria lechera, con el se persiguen varios propósitos entre ellos los siguientes (Alais, 1991):

1. Mejorar la calidad higiénica y la conservación de la leche mediante la destrucción de bacterias y enzimas, ejemplo: pasteurización, esterilización, etc.
2. Eliminación de agua: para la concentración o desecación de la leche o lactosuero
3. Con fines tecnológicos: preparación de la cuajada en la elaboración de quesos de pasta dura, en la preparación de aceites de mantequilla, en la fusión de quesos con sales fundentes, etc. (Alais, 1991).

Los tratamientos térmicos aplicados a la leche pueden generar cambios muy importantes en las propiedades y en el estado de sus componentes, dando como resultado en muchos casos, una disminución de la calidad de los productos lácteos. Los cambios más importantes generados en la leche por el tratamiento térmico son:

a) Desnaturalización de las proteínas solubles

La desnaturalización es cualquier cambio irreversible de algunas propiedades de las proteínas (Riel, 1991).

Las micelas de caseína son remarcablemente estables a temperaturas incluso por arriba de 140°C. En tanto que las proteínas del suero, son relativamente lábiles al calor, su desnaturalización ocurre alrededor de los 80°C (Varman y Sutherland, 1994).

Como resultado del calentamiento térmico, se destruyen las estructuras secundarias y terciarias que contribuyen a la estructura globular de la enzima. La destrucción de dichas estructuras, abre las cadenas polipeptídicas produciendo cambios en la solubilidad de las proteínas (Riel, 1991).

Las diversas proteínas presentan diferentes respuestas frente a los tratamientos térmicos, por ejemplo: en un calentamiento a 70°C, las inmunoglobulinas serán los componentes más afectados, desnaturalizándose en un 89%. Por otra parte, la

α -lactoalbúmina es más resistente ya que solo se desnaturalizará el 6%. En tanto que la β - lactoglobulina se desnaturalizará en un 32%. (Riel, 1991; Alais, 1991).

b) Aparición de grupos sulfhidrilo

Cuando la leche recibe un tratamiento térmico superior a los 70°C/ 30 minutos o 75°C/ 3 minutos, hay una liberación grupos -SH, esto origina una *disminución del potencial oxidó-reducción* y una *mayor resistencia de la leche a desarrollar gustos de oxidación*. Este fenómeno trae como resultado la aparición del gusto a cocido de la leche, lo cual es un defecto de calidad (Riel, 1991).

c) Alteración del equilibrio salino

El calor también afecta el equilibrio salino de la leche. El calcio y el fósforo coloidales tienden a separarse de la micela de calcio y precipitar en forma de fosfato tricálcico (Riel, 1991).

d) Inactivación y reactivación de las enzimas

Las enzimas también sufren cambios por el tratamiento térmico. De acuerdo a su resistencia frente al tratamiento térmico se clasifican:

aldolasa < α -amilasa < lipasa < fosfatasa alcalina < catalasa < xantin oxidasa < lactoperoxidasa < fosfatasa ácida (Alais, 1991).

Muchas de estas enzimas se desnaturalizan con tratamientos térmicos que van de los 60-100°C. Sin embargo, existen enzimas que se renaturalizan después de aplicárseles un tratamiento térmico como el UHT (135°-145°C durante un segundo o menos), tal es el caso de la fosfatasa alcalina, la catalasa y la lactoperoxidasa. Se ha observado que tras el tratamiento térmico, la actividad de estas enzimas es nula, sin embargo, esta reaparece a continuación gradualmente, aunque sin llegar a alcanzar la actividad original; sin embargo, en el caso de la fosfatasa es suficiente para dar un resultado positivo en la prueba del control del calentamiento (Alais, 1991).

Es posible que la enzima se encuentre bajo una forma intermedia inactiva, con la capacidad de volver a la forma inicial. También es posible que produzca una reacción reversible que afecte otros componentes necesarios para la actividad, por ejemplo los iones metálicos (Alais, 1991).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

- Determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad de la lactoperoxidasa de la leche

4.2. Objetivos Particulares

- Determinar la temperatura óptima, energía de activación de la reacción enzimática, energía activación de desnaturalización, y Q_{10} para la enzima.
- Determinar los parámetros D (tiempo necesario para destruir al 90% de la enzima) y Z (número de grados centígrados necesario para reducir D en un décimo) para la enzima.
- Determinar el efecto del calcio sobre la termoestabilidad de la enzima.
- Medir la actividad de lactoperoxidasa en productos lácteos comerciales (leches pasteurizadas, ultrapasteurizadas, reconstituídas, en polvo y en yogurt).

5. METODOLOGÍA

Para el desarrollo de los ensayos se empleó leche bronca de la ordeña de la mañana, colectada en un recipiente limpio y seco.

5.1 Determinación de la actividad de lactoperoxidasa

Para la determinación de la actividad en las muestras, se empleó 2,2 Azino-dí(3-ethylbenzthiazoline-6sulfonic acid) (ABTS de Sigma) como substrato cromogénico para la lactoperoxidasa (Childs y Bardsley, 1975; Bojorck, 1992), utilizando el método empleado por Ekstrand y col. (1985).

En una celda de vidrio se colocaron 3.0mL de una solución de ABTS 1.0 mM en solución amortiguadora de acetatos 0.1M pH 4.4, después se agregaron 0.10mL de una dilución 1:10 de muestra (leche, suero o sobrenadante de leche) en agua destilada. La celda fue incubada durante 5 minutos para estabilizar la temperatura requerida para cada ensayo. Para iniciar la reacción se adicionaron 0.1 mL de peróxido de hidrógeno 3.2mM (Sigma), inmediatamente después, la celda se agitó y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 412 nm continuamente durante 3 minutos a 30°C (Ekstrand y col., 1985; Pruitt y col. 1990) empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV 160 con control de temperatura.

La actividad de la enzima se midió durante tres minutos en los cuales la absorbancia se incrementaba linealmente con respecto al tiempo. El coeficiente de adsorción molar empleado para los cálculos fue $32,400\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Ekstrand y col., 1985; Pruitt y col., 1990; Moldoveanu, y col. 1982). La velocidad inicial (V_0) se calculó como la pendiente de la recta resultante de la gráfica de concentración de producto generado contra tiempo.

5.2. Determinación del efecto de la temperatura sobre la actividad de lactoperoxidasa en leche

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad de lactoperoxidasa en leche, se realizó una dilución 1:10 de leche bronca en agua destilada. Posteriormente, la actividad de la lactoperoxidasa se determinó por triplicado empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 con control de temperatura tal y como se indicó en el inciso 6.1, solo que en este caso, la actividad fue medida a 20°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C y 70°C.

5.3 Estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad de lactoperoxidasa en suero.

Para esta determinación, en primer término, se obtuvo el suero de la siguiente manera:

La leche bronca fue calentada a 30°C y entonces se le agregaron 0.2 mL de una preparación de quimosina (Cuamex) por litro de leche. Se agitó la leche para distribuir uniformemente a la enzima la cual se dejó actuar durante 1h aproximadamente.

Una vez formado el gel, éste se cortó en pedazos pequeños para facilitar la separación del suero. Una vez separado el suero, se filtró a través de un filtro de algodón y se centrifugó a 10,000 r.p.m. durante 30min, a 4°C, con el fin de separar la grasa y la caseína que hubieran quedado suspendidas.

La actividad de la enzima en el suero fue determinada de la misma manera que se hizo en leche en un intervalo de temperaturas de 20-70°C.

5.4 Determinación del efecto del tratamiento térmico de la leche sobre la actividad de lactoperoxidasa

Para estudiar el efecto del tratamiento térmico, la leche se separó en 6 lotes. Cada

lote se sometió a una temperatura distinta (60°C, 65°C, 68°C, 70°C, 72°C y 75°C) durante diferentes intervalos de tiempo.

Los ensayos se realizaron con muestras de leche bronca (10mL) las cuales fueron calentadas y mantenidas en un baño de agua a las temperaturas indicadas, y la actividad medida a los intervalos de tiempo indicados en cada caso. Después del tratamiento térmico, las muestras fueron enfriadas en un baño de hielo y posteriormente centrifugadas a 15,000 r.p.m., durante 40min a 4°C, en una centrifuga Beckman modelo J2-MI. Finalmente, la actividad de lactoperoxidasa fue determinada a 30°C por triplicado tal y como se expresó en el inciso 6.1.

Es importante señalar que tiempo se empezó a contar en el momento en el cual se alcanzaba la temperatura deseada en el interior del tubo

5.5 Determinación del efecto del calcio sobre la actividad de lactoperoxidasa en leche

Para determinar el efecto del calcio sobre la termoestabilidad de la lactoperoxidasa, se realizó mediante el siguiente procedimiento:

- En un tubo de ensayo se colocaron 1 mL de cada una de las muestras de leche y 9mL de solución de cloruro de calcio a diferentes concentraciones (0.025 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.15 M, 0.3 M, 0.6 M y 1 M) en buffer de tris 0.1M a pH 7 en agua desionizada.
- Se aplicaron de tratamientos térmicos a 60° °C, y 80°C durante 10 minutos.
- Se enfriaron las muestras en baño de hielo
- -Se centrifugaron las muestras a 15,000 r.p.m a 4°C y durante 40min, en una centrifuga Beckman modelo J2-MI.
- -Se midió la actividad de lactoperoxidasa por triplicado.

5.6 Determinación de la actividad de lactoperoxidasa en productos lácteos comerciales

La evaluación de la intensidad del tratamiento térmico aplicado a la leche durante la elaboración de productos lácteos, puede determinarse por medio de la medición de la actividad de la lactoperoxidasa. Para estudiar dicho efecto, se emplearon varias marcas comerciales de leches pasteurizadas, reconstituidas, en polvo, ultrapasteurizadas y yogurt natural.

a) Determinación en leches fluidas

Para hacer esta determinación se emplearon tres lotes diferentes de las marcas comerciales de leche fluida: Alpura, Lala, Boreal, La Suiza, Nutrilache y Vitaleche. Dichas marcas se emplearon porque son las de mayor presencia en el mercado de las leches fluidas). Cada una de las muestras se centrifugaron a 15,000r.p.m. a 4°C durante 40min, esto se realizó con el objeto de separar la caseína y la grasa y se midió la actividad en el sobrenadante como en el inciso 5.6.

a) Determinación en leches en polvo

Para hacer esta determinación, se emplearon las marcas Nido y Svelty. Estas leches fueron reconstituidas, de la siguiente manera:

- Leche Nido: 14.4g leche en polvo/100mL agua destilada
- Leche Svelty: 12g leche en polvo/100mL agua destilada

Una vez reconstituidas las leches, se centrifugaron a 15,000 r.p.m. a 4°C, durante 40 min (Para separar la caseína y la grasa). Finalmente, se midió la actividad.

b) Medición en yogurt

Las marcas de yogures naturales empleadas en esta determinación fueron: Alpura, Lala, Nestlé, Svelty y Yoplait. Para medir la actividad en estos productos lácteos se pesó un gramo de producto y se aforó a 10mL con de agua destilada; de dicha dilución, se tomó una alícuota de 0.1mL para hacer la determinación de actividad.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la lactoperoxidasa de la leche

Existen varios factores que pueden alterar la actividad y la estabilidad de las enzimas, tales como: la fuerza iónica, el pH y por supuesto la temperatura. En cuanto al efecto de este último factor, se sabe que las reacciones enzimáticas al igual que las reacciones químicas ocurren a una mayor velocidad cuando la temperatura es incrementada (Segel, 1976). Este efecto puede ser representado por la ecuación de Arrhenius:

$$k = A e^{-E_a/RT}$$

o bien

$$\log k = \frac{E_a}{2.303 RT} + \log A$$

donde:

k = constante de la velocidad de reacción (min^{-1})

A = constante llamada factor de frecuencia (min^{-1}) o constante de Arrhenius.

E_a = energía de activación (cal/mol)

T = temperatura absoluta (K)

R = constante de los gases (1.98cal/ K mol)

Dado que el principal objetivo de nuestro trabajo fue la caracterización térmica de la enzima, como parte inicial de este trabajo se midió la actividad de lactoperoxidasa en leche a varias temperaturas (20-70°C), y empleando la ecuación de Arrhenius, se

determinaron la temperatura óptima, energía de activación de la reacción enzimática, energía de activación de la desnaturalización y Q_{10} en leche y suero.

Determinación de la temperatura óptima, energías de activación de la reacción enzimática y de desnaturalización de la lactoperoxidasa en leche y Q_{10} .

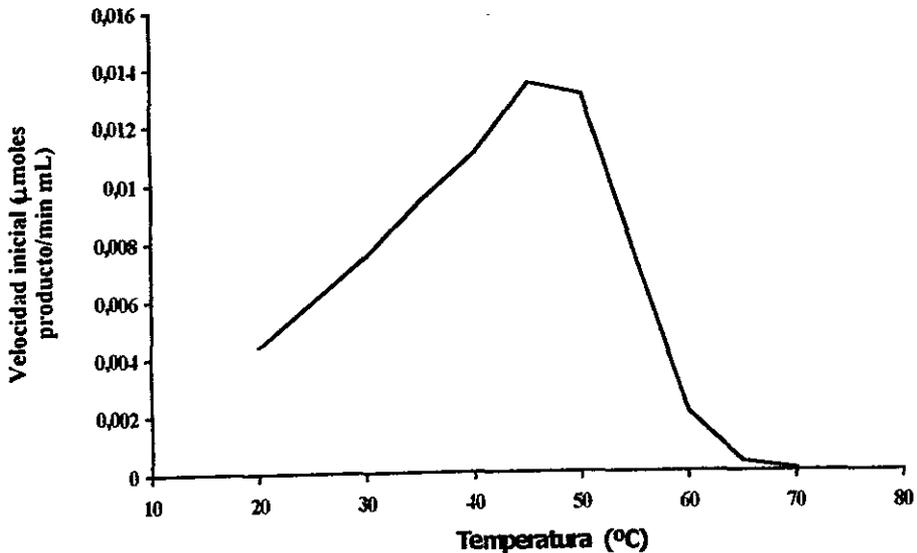
Para determinar la temperatura óptima, energías de activación y Q_{10} en leche, se midieron por triplicado las velocidades iniciales para la lactoperoxidasa entre 20°C y 70°C. En la tabla 6.1, se muestran los promedios de las velocidades iniciales a varias temperaturas, así como también las transformaciones pertinentes realizadas para posteriormente trazar la gráfica de \ln de la velocidad inicial vs $1/T(K^{-1})$ y determinar la energía de activación de la reacción enzimática, la energía de activación de desnaturalización y Q_{10} .

Tabla 6.1. Efecto de la temperatura sobre la actividad de lactoperoxidasa

Temperatura (°C)	T (K)	V_o (μ moles producto/min ml)	$1/T$ (K^{-1})	$\ln V_o$
20	293.15	4.4×10^{-3}	0.00341122	-5.4261
30	303.15	7.5×10^{-3}	0.00329870	-4.8928
35	308.15	9.4×10^{-3}	0.00324510	-4.6670
40	313.15	1.1×10^{-2}	0.00319336	-4.5098
45	318.15	1.34×10^{-2}	0.00314317	-4.3125
50	323.15	1.3×10^{-2}	0.00309454	-4.3428
55	328.15	7.46×10^{-3}	0.00340793	-4.8981
60	333.15	2.05×10^{-3}	0.00300165	-6.1899
65	338.15	3.35×10^{-4}	0.00295727	-8.0001
70	343.15	8×10^{-5}	0.00291417	-9.4334

Empleando los resultados de la tabla anterior, se trazó la gráfica de velocidad inicial vs temperatura (Figura 6.1), en ella se observa que la enzima alcanza la mayor actividad en un intervalo de temperatura entre 45 y 50°C.

Figura 6.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la lactoperoxidasa en leche.



Para conocer la temperatura óptima así como las energías de activación de la reacción enzimática y desnaturalización, se empleó el método de Arrhenius, y se trazó la gráfica de \ln actividad vs $1/T(K^{-1})$ (Figuras 6.2 y 6.3).

La temperatura óptima se determinó calculando el punto en el cual las curvas de energías de activación de la reacción enzimática y desnaturalización se intersecaron (Figura 6.3). Para ello, las ecuaciones de cada recta se igualaron. La temperatura óptima calculada de esta manera fue: **50.6°C**.

Los valores de energías de activación de las reacciones enzimática y de desnaturalización se determinaron mediante las pendientes de las rectas. Para la de la

reacción enzimática, se tomaron las velocidades iniciales obtenidas entre 20°C y 45°C, y para la de desnaturalización, las velocidades obtenidas entre 55°C y 70°C (Tabla 6.2).

Los valores obtenidos se encuentran entre los reportados en la literatura, en ésta se dice que en general, las energías de activación para las transformaciones catalizadas por enzimas, se encuentran en un rango de 6000-15,000 cal/mol, mientras que las energías de activación para la desnaturalización, se hallan en un rango de 50,000-150,000 cal/mol (Whitaker, 1994).

Tabla 6.2. Energías de activación de la reacción enzimática y de desnaturalización para la lactoperoxidasa en leche

	Valor(cal/mol)	r
Ea de la reacción enzimática	8178.78	0.9965
Ea de desnaturalización.	58174.38	0.9834

Figura 6.2. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la lactoperoxidasa en leche

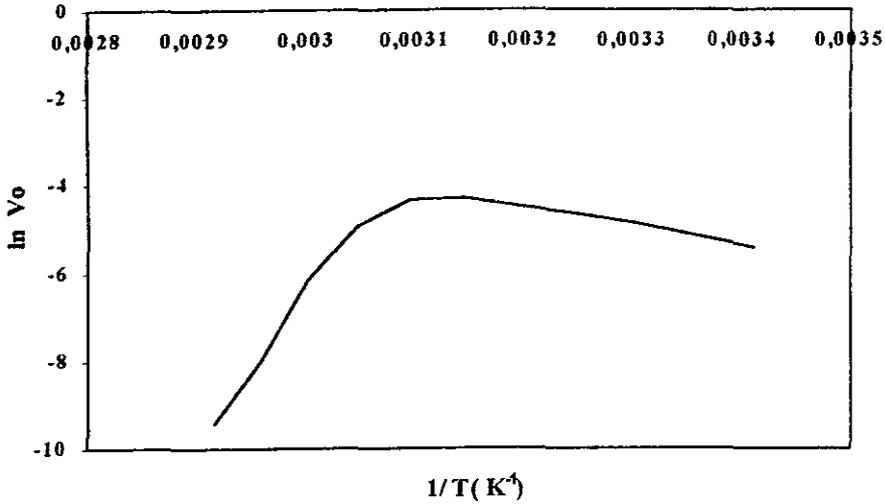
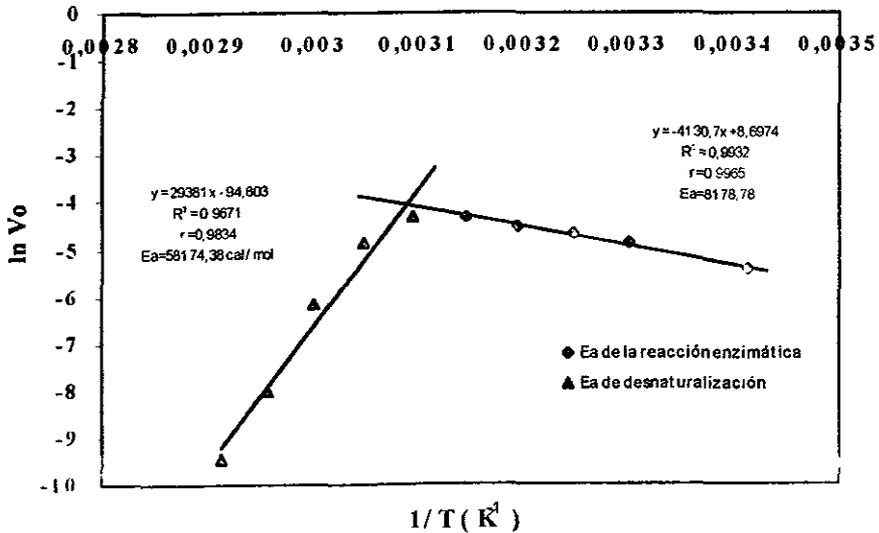


Figura 6.3. Determinación de las energías de activación de la reacción enzimática y de desnaturalización en leche



Determinación de Q_{10}

El efecto de la temperatura sobre la velocidad de las reacciones es frecuentemente expresada en términos de un coeficiente de temperatura, mejor conocido como Q_{10} (Segel, 1976) Este término se expresa como una relación de dos velocidades a dos temperaturas con una diferencia de 10°C entre ellas (Badui, 1981):

$$Q_{10} = \frac{\text{Velocidad de reacción a } T+10^{\circ}\text{C}}{\text{Velocidad de reacción a } T(^{\circ}\text{C})} \quad (1)$$

En nuestro estudio, Q_{10} promedio determinado a partir de la recta ajustada para la energía de activación de la reacción enzimática de la gráfica de la figura 6.3 fue de 1.53.

6.1.1. Efecto de la temperatura sobre la actividad de lactoperoxidasa en suero.

Al igual que en leche, el efecto de la temperatura sobre la actividad de lactoperoxidasa fue estudiado en suero de leche. Esto se realizó con el fin de analizar de que manera se veían afectados estos valores después de haber precipitado la mayor parte de las proteínas, grasas y calcio.

La temperatura óptima se determinó al igual que en leche, y el valor obtenido fue de 50°C (Figuras 6.4-6.6), este valor es muy parecido a el valor observado en leche, 50.6°C.

Figura 6.4 Efecto de la temperatura sobre la actividad de lactoperoxidasa en suero

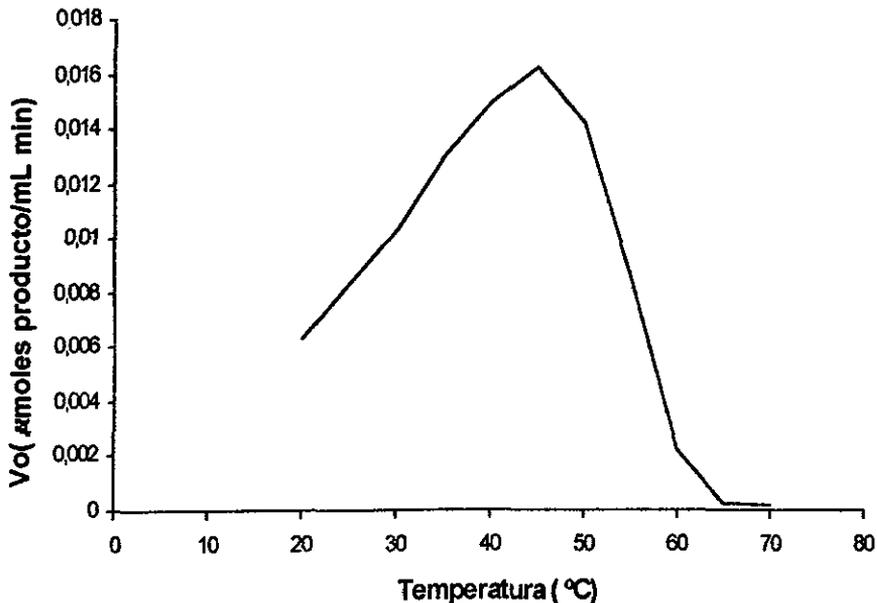


Figura 6.5 Efecto de la temperatura sobre la actividad de lactoperoxidasa en suero

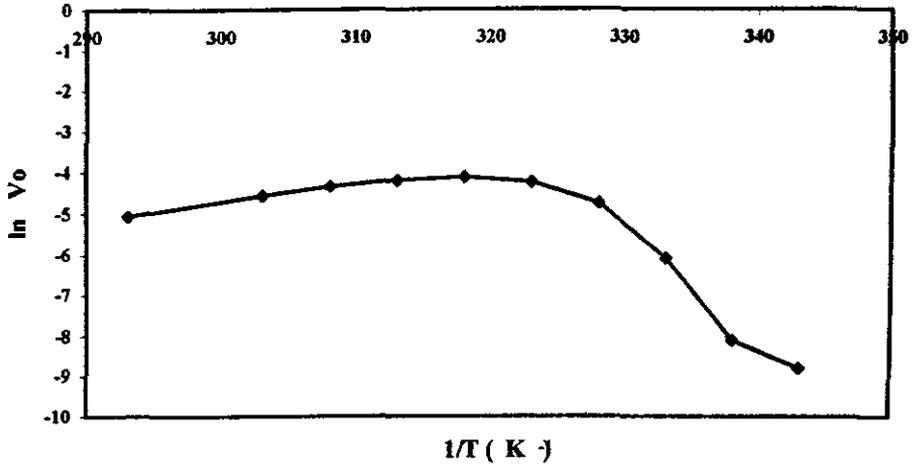
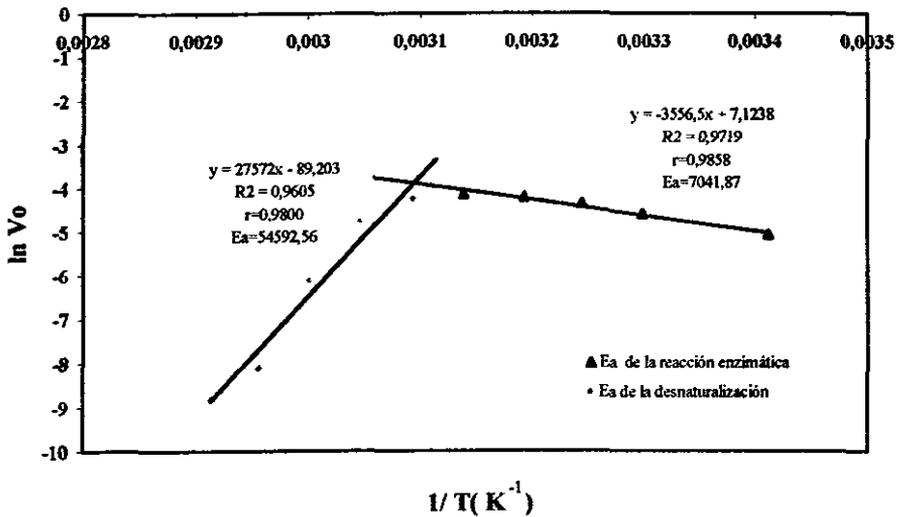


Figura 6.6. Determinación de las energías de activación y desactivación de lactoperoxidasa en suero



Con base en lo anterior, se obtuvieron los resultados reportados en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3. Energías de activación para la reacción enzimática y desnaturalización de la lactoperoxidasa en suero.

	Valor (cal/mol)	r
Ea de reacción enzimática	7041.87	0.9858
Ea de desnaturalización	54592.56	0.9800

El valor Q_{10} promedio para lactoperoxidasa en suero fue de 1.44, y se obtuvo a partir de la ecuación de la recta de la energía de activación para la reacción enzimática (Figura 6.6).

Tabla 6.4. Valores de Q_{10} de lactoperoxidasa en leche y suero

Medio en el cual se hizo la determinación de actividad	Valor de Q_{10}
Leche	1.53
Suero	1.44

Con base en los valores de las energías de activación para la reacción enzimática y de desnaturalización, Q_{10} y temperatura óptima, obtenidos tanto en leche como en suero (Tablas 6.2, 6.3 y 6.4), podemos observar que no hay diferencia significativa entre los valores obtenidos, lo cual sugiere que probablemente las proteínas, grasa y calcio coloidal no afectan de manera significativa a la estructura y a la actividad de la enzima

6.2. Efecto del tratamiento térmico de la leche sobre la actividad de lactoperoxidasa

Para estudiar el efecto del calentamiento de la leche sobre la actividad de lactoperoxidasa, la leche fue sometida a tratamientos térmicos entre 60 y 75°C hasta 30 minutos. La actividad residual fue medida a diferentes intervalos de tiempo dependiendo de la temperatura. Se encontró que al aplicar un tratamiento térmico de 72°C durante cinco minutos, la enzima aún conserva más del 60% de su actividad original (Figura 6.11). Esta particularidad actualmente es empleada en algunos países de Europa, ya que las regulaciones requieren que la leche pasteurizada sea lactoperoxidasa positiva (Barrett y col., 1998). El encontrar lactoperoxidasa positiva nos sugiere que el tratamiento térmico aplicado fue el correcto. Por otra parte, al aplicar un tratamiento térmico de 75°C, se pierde aproximadamente el 60% de actividad original en menos de un minuto (Figura 6.12).

A continuación se muestran las curvas de inactivación de lactoperoxidasa obtenidas para cada temperatura.

Figura 6.7. Curva de inactivación a 60°C

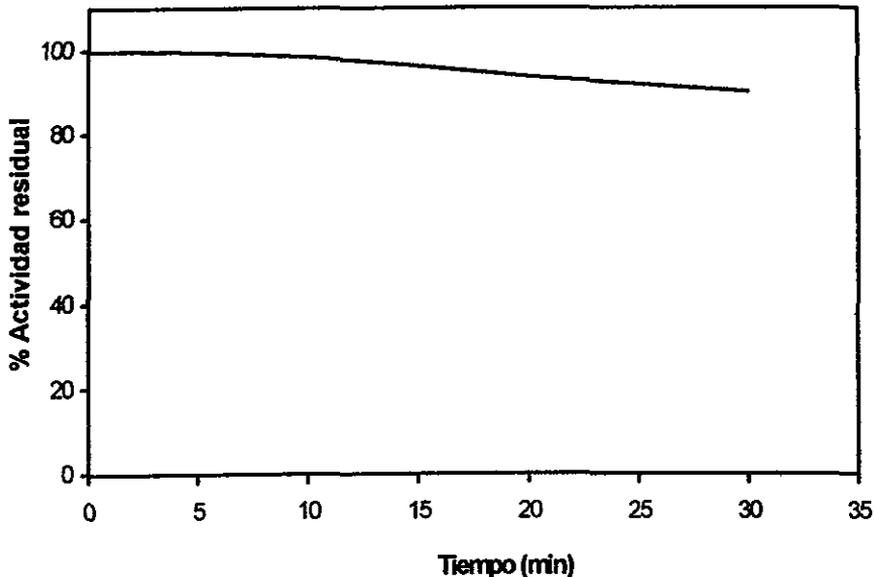


Figura 6.8. Curva de inactivación a 65°C

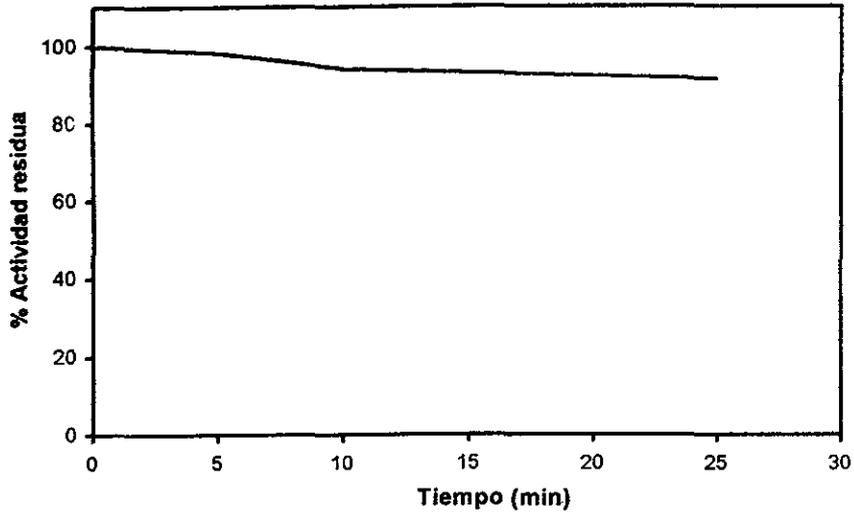


Figura 6.9. Curva de inactivación a 68°C

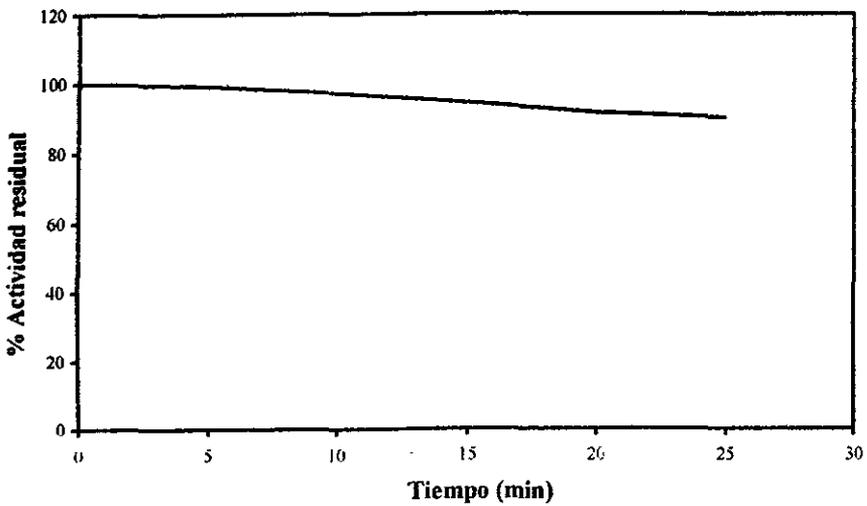


Figura 6.10. Curva de inactivación a 70°C

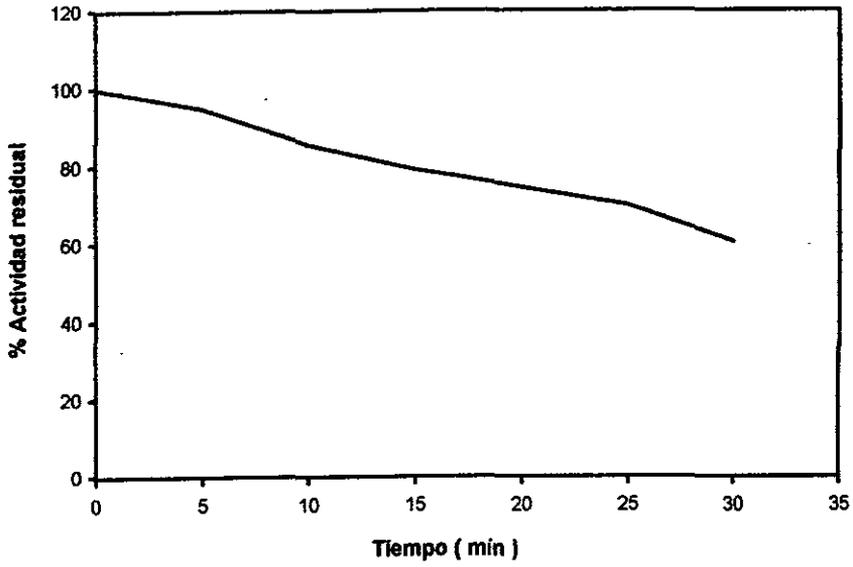


Figura 6.11. Curva de inactivación a 72°C

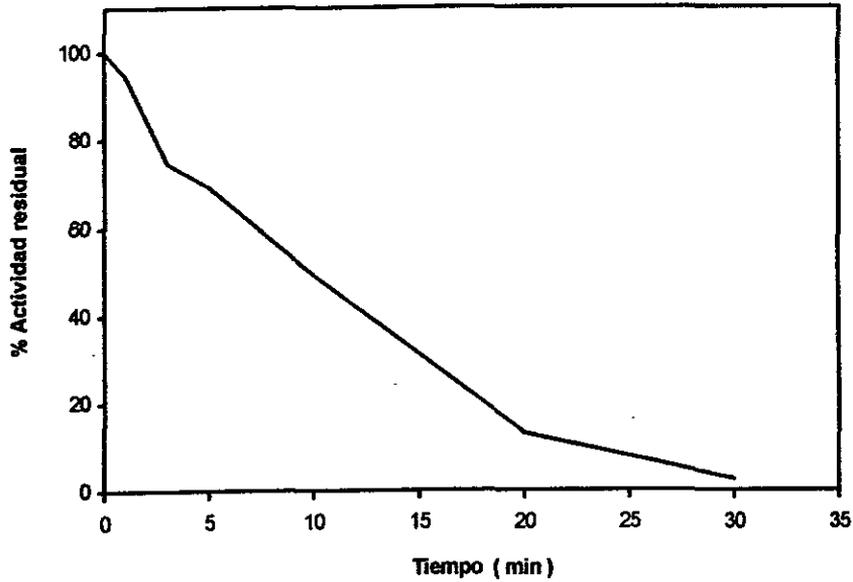
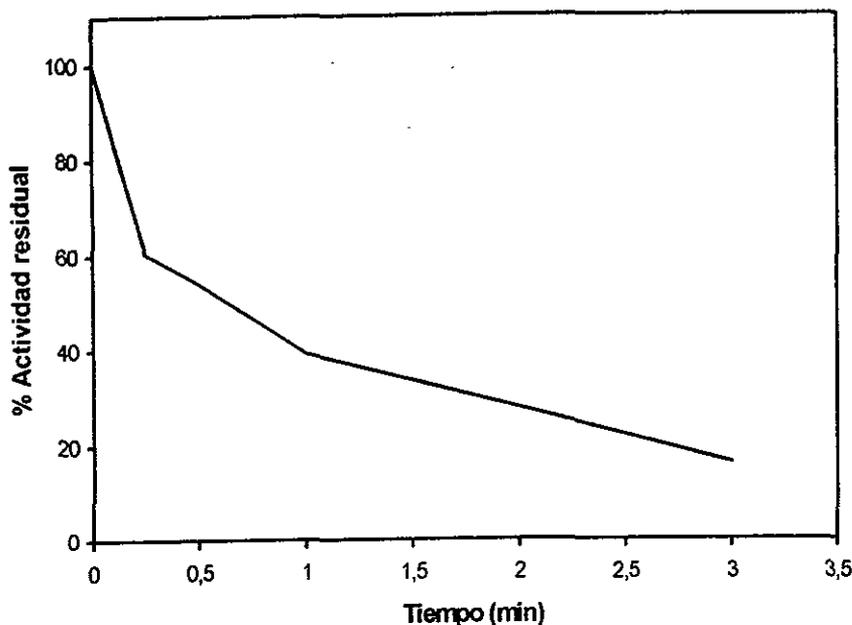
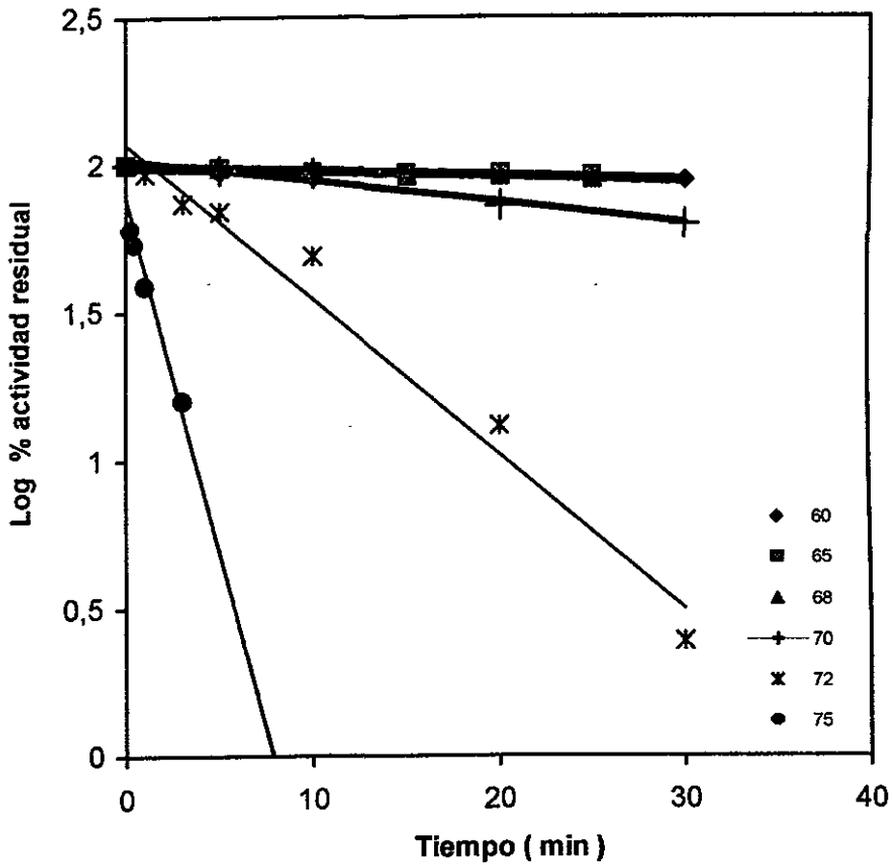


Figura 6.12. Curva de inactivación a 75°C

En las gráficas de las figuras 6.7-6.12, podemos observar que la enzima fue muy estable si el tratamiento térmico empleado estaba en un rango de temperatura entre 60-68°C, sin embargo, a partir de 70°C, la estabilidad de la enzima disminuyó drásticamente. Estos resultados coinciden en parte con los reportados por Barret y col (1998), quienes observaron que la inactivación de la lactoperoxidasa no ocurría entre 60 y 66°C, así mismo, observaron que a partir de 67°C la enzima se volvía muy sensible a cambios en 1°C.

Los resultados de las gráficas 6.7-6.12, se pueden visualizar mejor de una manera conjunta en la gráfica 6.13 de Log % actividad residual vs tiempo. En dicha gráfica podemos observar que no hay diferencia significativa de la pérdida de actividad entre 60°C y 68°C, tan es así que las curvas se sobreponen, y solo después de 70°C, la enzima empieza a ser más sensible a cambios de temperatura pequeños.

Figura 6.13 Inactivación térmica de la lactoperoxidasa en leche



6.2.1 Determinación de los parámetros D y Z.

Como parte del estudio del efecto del calentamiento sobre la actividad de lactoperoxidasa en leche, se hizo la determinación de los parámetros D y Z (de 60 a 75°C). D es el tiempo necesario para inactivar al 90% de la enzima y Z (numero de °C necesarios para cambiar el valor D en un factor de 10 (Figura 6.14). El valor D se calculó a partir de la pendiente resultante de la gráfica de \ln % actividad residual vs tiempo (min), tal y como se ilustra en la figura 6.14. Los valores de D obtenidos para las temperaturas se muestran en la tabla 6.5.

Figura 6.14. Determinación de D para lactoperoxidasa a 72°C

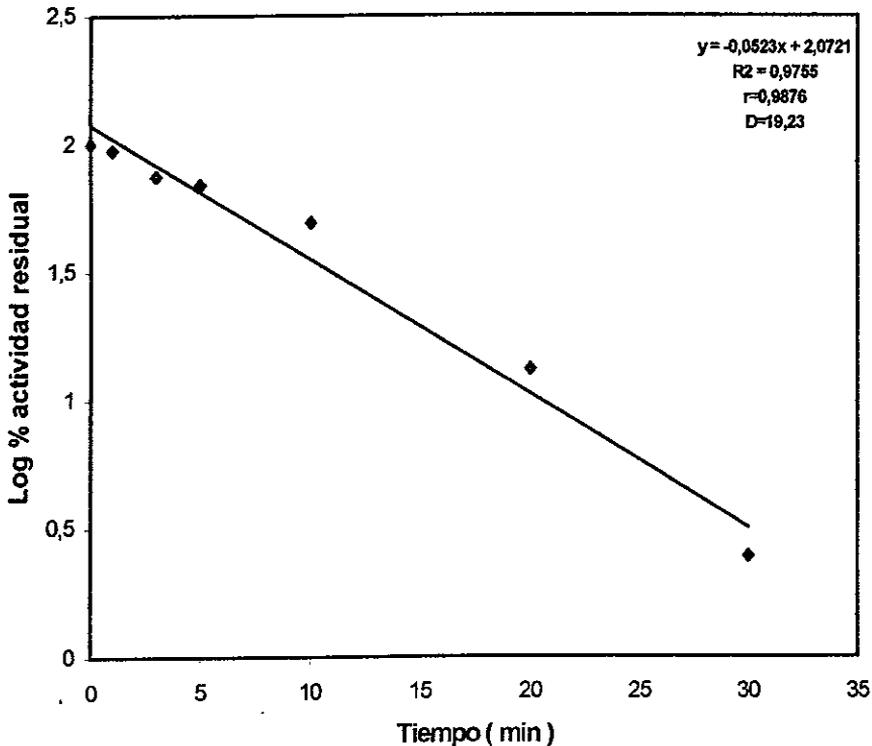


Tabla 6.5 Valores de D obtenidos para lactoperoxidasa entre 60 y 75°C

T(°C)	D (min)	r
60	666.66	0.9766
65	625.00	0.9582
68	476.19	0.9669
70	147.05	0.9827
72	19.23	0.9876
75	4.23	0.9697

Con los valores D calculados para cada temperatura, se determinó el valor de Z, trazando una gráfica de log D vs temperatura (°C). El valor de D obtenido a 60°C no se empleó en la determinación de Z porque a esa temperatura no hubo inactivación (figura 6.15).

Figura 6.15. Determinación de Z (65°C-75°C)

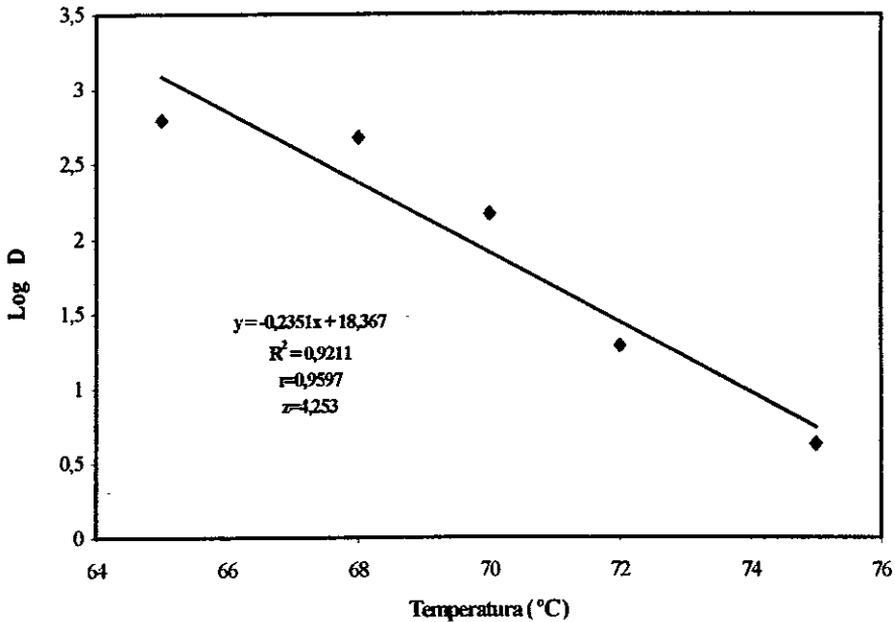
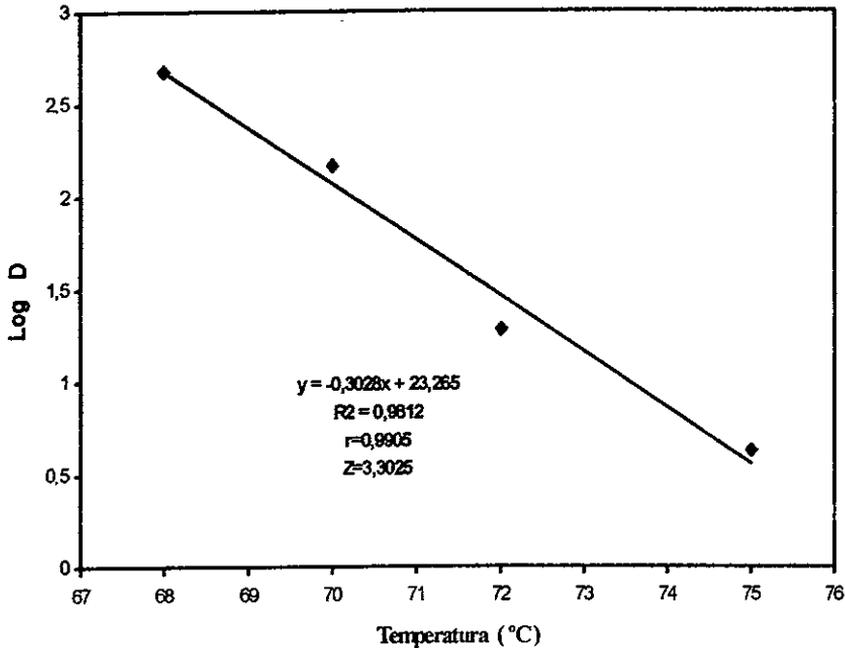


Figura 6.16 Determinación de Z (68°C-75°C)

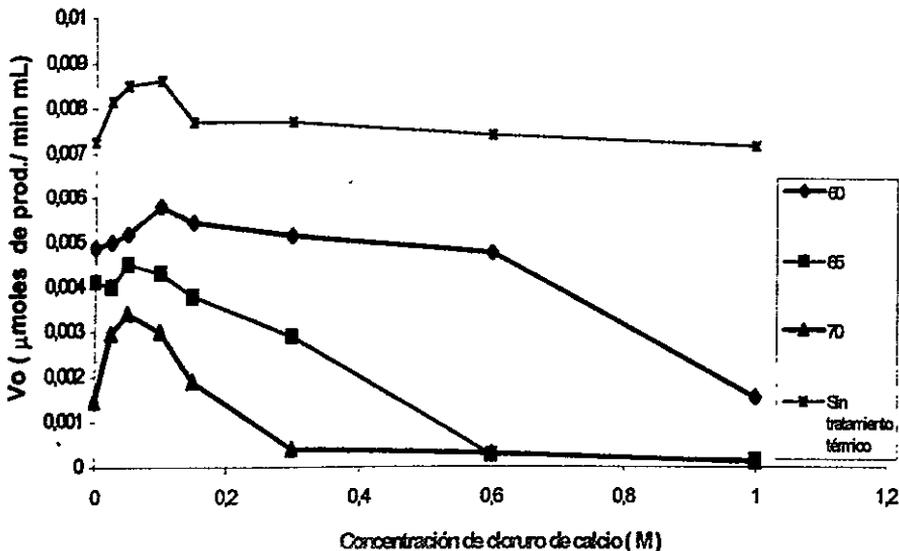
En la literatura se ha reportado que en experimentos corridos con pasteurización alta (HTST), el valor calculado para Z entre 70 y 80°C es de 3.5°C (Barrett y col., 1998). Por su parte Griffiths en 1986 determinó dicho valor en 5,4°C para un rango de temperatura entre 65-80°C. Finalmente, Barrett y col. (1998), trabajaron en un rango de temperaturas entre 67-65°C, y determinaron el valor de Z entre 2.83 y 3.5°C. en este estudio, el valor determinado de Z fue de 4.23°C, en un intervalo de temperaturas de 65-75°C (Figura 6.15), mientras que si tomamos en cuenta que a 65°C tampoco ocurre inactivación detectable, y empleamos en la determinación del valor Z únicamente los valores de log D comprendidos entre 68-75°C, el valor de Z es 3.3°C (Figura 6.16), este valor se encuentra en el intervalo de los valores obtenidos por Barrett y col (1998).

6.3 Efecto de la concentración de calcio sobre la actividad de lactoperoxidasa.

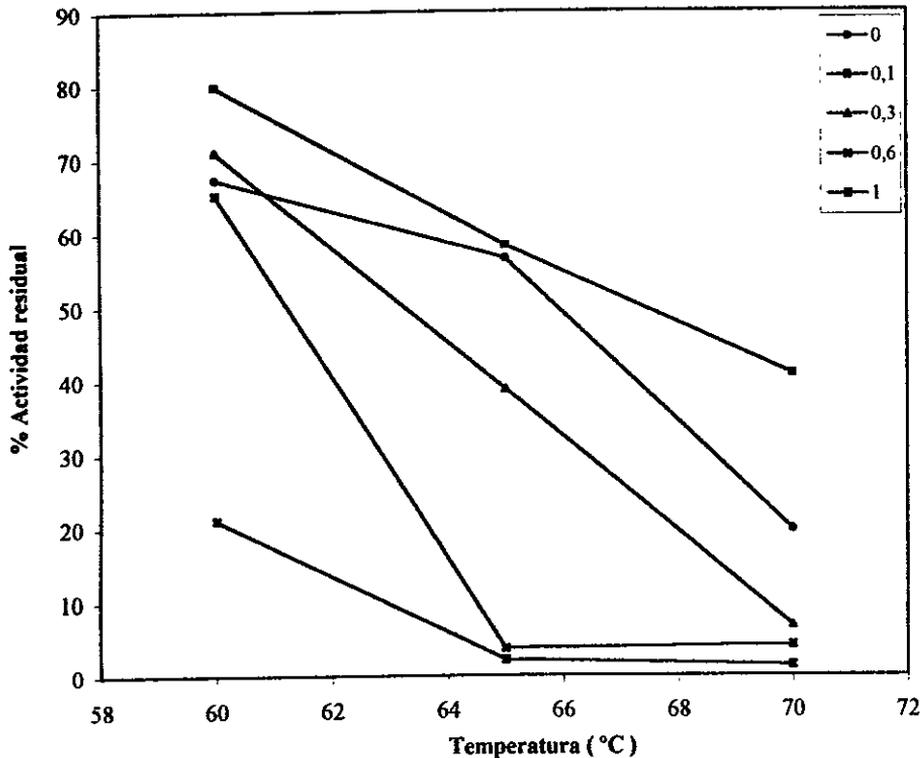
Estudios previos, han establecido que el ión calcio incrementa la actividad de lactoperoxidasa cuando ésta ha recibido un tratamiento térmico, dicha actividad aumenta si la concentración de calcio incrementa hasta una fuerza iónica de 0.03 (Sato y col., 1992). Para estudiar el efecto que tenía el calcio sobre la actividad de lactoperoxidasa en leche, ésta se calentó durante 10 minutos a 60, 65 y 70°C, y en presencia de diferentes concentraciones de cloruro de calcio (0.1, 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.3, 0.6, y 1M). Los resultados se presentan en las figuras 6.17 y 6.18.

En la figura 6.17, se puede ver que la actividad de lactoperoxidasa aumenta gradualmente si se aumenta la concentración de cloruro de calcio hasta un máximo entre 0.1–0.15M. Sin embargo, al realizar un análisis estadístico (análisis de varianza y prueba de Tukey), se demostró que el calcio a concentraciones bajas no aumenta de manera significativa ($\alpha=0.0001$) la actividad de la enzima.

Gráfica 6.17. Efecto de la concentración de calcio sobre la actividad de lactoperoxidasa en leche a diferentes temperaturas



Gráfica 6.18. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la lactoperoxidasa en presencia de cloruro de calcio.



En la gráfica de la Figura 6.18, podemos observar el efecto termoestabilizante del calcio (0.1M) no es muy claro. Es decir, no hay un aumento significativo de la actividad de la lactoperoxidasa frente a la temperatura en presencia de cloruro de calcio. Lo que sí es muy claro es que conforme se aumenta la concentración de cloruro de calcio, la enzima pierde actividad independientemente de la temperatura aplicada, esto sugiere que la presencia de altas concentraciones de cloruro de calcio deshidratan a la enzima y por lo tanto desestabilizan su estructura, debido a que ya no existe parte del agua que la rodeaba y que le servía como agente estabilizante. El eliminar el agua probablemente obligó a las moléculas de la enzima a interactuar entre sí, de tal manera se agregaron y finalmente precipitaron

6.4 Medición de la actividad de lactoperoxidasa en productos lácteos.

La lactoperoxidasa es una enzima que puede emplearse para determinar si la leche ha recibido un tratamiento térmico de pasteurización adecuado. Esta enzima cada vez toma más importancia, un ejemplo de ello es la legislación Europea la cual ahora requiere que la leche pasteurizada sea positiva para lactoperoxidasa (Barrett y col., 1998). La determinación de esta enzima se ha hecho cualitativamente, sin embargo, sería interesante hacer determinaciones cuantitativas, ya que éstas nos darían una mayor visión acerca del tratamiento térmico aplicado.

La importancia de lactoperoxidasa va más allá de la determinación de un tratamiento térmico adecuado, ya que dicha enzima también podría emplearse para activar el sistema lactoperoxidasa y con ello podría aumentarse la vida de anaquel de los productos lácteos tales como la leche pasteurizada.

La actividad de lactoperoxidasa fue medida por triplicado en tres lotes de leches pasteurizadas, leches UHT, leches reconstituidas, leches en polvo, y yogures comerciales. Como resultado de dichas determinaciones, se encontró actividad de lactoperoxidasa en la mayoría de las leches pasteurizadas. En leches reconstituidas se encontró muy baja actividad en tanto que en leches ultrapasteurizadas, leches en polvo y en yogures comerciales (tabla 6.6) la actividad fue nula. Estos resultados nos dicen que los tratamientos térmicos aplicados sobrepasaron los 72°C y por lo tanto la mayor parte de la enzima se desnaturalizó.

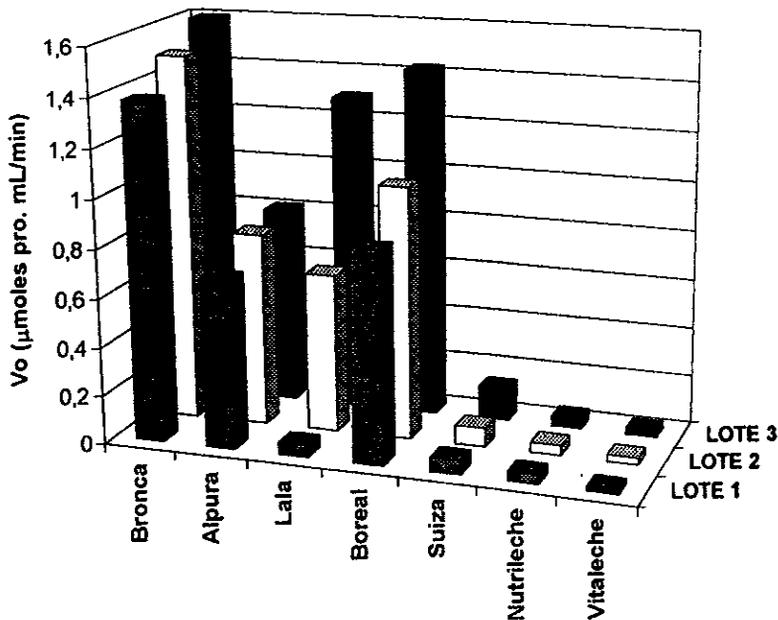
Tabla 6.6. Productos lácteos empleados en la determinación de lactoperoxidasa

Leches reconstituidas	Leches pasteurizadas	Leches ultrapasteurizadas	Leches en polvo	Yogures
Nutrileche	Alpura	Lala	Nido	Alpura
Vitaleche	Boreal Lala Suiza	Alpura 2000	Svelty	Lala Nestlé Svelty Yoplait

En la figura 6.19, podemos observar que en las leches tanto pasteurizadas como reconstituidas se encontró actividad de lactoperoxidasa, sin embargo, la actividad fue mayor en las leches pasteurizadas (excepto en la leche La Suiza) que en las leches reconstituidas cuando son secadas. Este hecho nos confirma que el tratamiento térmico empleado en las leches reconstituidas es más severo que el empleado para las leches pasteurizadas. El haber encontrado una actividad tan baja en la leche pasteurizada marca La Suiza en tres lotes estudiados, puede deberse a que el tratamiento térmico empleado no fue el correcto, o también pudiera deberse a que tal vez no están partiendo de leche bronca, sino de leche reconstituida, ya que los lotes fueron analizados en distintas fechas. Lo mismo puede concluirse para uno de los lotes de leche Lala.

Finalmente, podemos agregar que el medir cuantitativamente los niveles de lactoperoxidasa en las leches que han recibido tratamientos térmicos de pasteurización podría ser una alternativa para un control de calidad.

Figura 6.19 Actividad de lactoperoxidasa en leches comerciales



7. CONCLUSIONES

- ◆ La lactoperoxidasa es una enzima estable a la temperatura y alcanza su temperatura óptima alrededor de los 50°C.
- ◆ Los valores de energías de activación de la reacción enzimática y de desnaturalización, así como Q_{10} obtenidos en leche no se vieron afectados al precipitar la mayor parte de la grasa y la caseína presentes en leche.
- ◆ La lactoperoxidasa es una enzima estable en un intervalo de temperaturas entre 60 y 70°C, sin embargo, es muy sensible a cambios pequeños de temperatura por arriba de 70°C.
- ◆ El valor de Z calculado para un intervalo de temperaturas entre 68°C y 75°C fue de 3.3°C.
- ◆ La presencia de bajas concentraciones de calcio (0,1-0.15M), no aumentó significativamente la actividad de la lactoperoxidasa.
- ◆ La presencia de calcio disminuye considerablemente la actividad de la enzima cuando la concentración aumenta por arriba de 0.15M, independientemente de la temperatura aplicada.
- ◆ Solamente en la mayoría de las leches pasteurizadas y en menor grado en las leches reconstituidas se encontró actividad de lactoperoxidasa, lo cual nos sugiere que los tratamientos térmicos aplicados en la elaboración de los otros productos eliminaron completamente a la enzima debido al empleo de temperaturas por arriba 70°C y/o tiempos prolongados.
- ◆ La medición de la actividad de lactoperoxidasa por el método empleado en este trabajo, podría utilizarse como una alternativa para tener un control más preciso de los tratamientos térmicos aplicados a la leche.

8. Bibliografía

- Aguilar Muslera R.L. (1990) **Reactivación del Sistema Lactoperoxidasa durante el almacenamiento y su efecto sobre el sabor del yogurt**, Tesis, Universidad La Salle.
- Alais C. (1991) **Ciencia y tecnología de la leche, principios de la técnica lechera**, edit. CECSA, Mexico.
- Andrews A.T. (1991) **Cap. 2: Indigenous Enzymes in milk**, en Food enzymology, Editor Fox P.F., Elsevier Applied Science, Oxford, U.K.
- Badui D. S. (1981) **Química de los alimentos**, edit. Alambra-Universitaria, México.
- Banks, J.G. y Board R.G. (1985) **Preservation by the lactoperoxidase system (LP-S) of a contaminated infant milk formula**, Lett. Appl. Microol., 1, 81-85.
- Barrett N.E., Grandison A. S. y Lewis M.J. (1998) **Thermal inactivation of lactoperoxidase between 60 and 75 °C**.IFT Annual Meeting: Book of Abstracts.
- Beuchat L. R. y Golden D.A. (1989) **Antimicrobials Occurring naturally in foods**, Food Technol., 43(9), 134-142.
- Beumer R.R, Noomen A., Majarijs J.A. y Kampelmacher E.H. (1985) **Antibacterial action of the lactoperoxidase system on Campylobacter jejuni in cow's milk**, Neth. Milk Dairy J., 39, 107-114.
- Björck L. (1978) **Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychotropic bacteria in milk**, J. Dairy Res , 45, 109-118.
- Bojörk L. (1992), **Cap. V: Lactoperoxidase**, en Advanced Dairy Chemistry, vol 1: Proteins, editor P.F Fox. Elsevier Applied Science, Londres.
- Björck L., Rosen C.G., Marshall V. y Reiter B. (1975) **Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against Pseudomonas and other gram-negative bacteria**, Appl. Microbiol., 30(2), 199-204.
- Blais J.E, Boulet M. y Julien J-P. (1991), **Cap: X : Leches concentradas y leche en polvo**, en Ciencia y Tecnología de la leche, editor Amiot, J., Acribia, Zaragoza , España.

- Bonning G., Julien J-P., Lavoie M., Michel J.-C. (1991) Cap. VII: **Leche de consumo**, en *Ciencia y Tecnología de la leche*, editor Amiot, J., Acribia, Zaragoza, España.
- Booth, K., Kimura S., Lee C., Ikeda -Saito I, M., y Caughey, W.S. (1989) **Bovine mieloperoxidase and lactoperoxidase each contain a high affinity site for calcium**, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 160(2), 897-902.
- Champagne C. y Goulet J. (1991) Cap: III **Microbiología de la leche**, en *Ciencia y tecnología de la leche*, editor: Amiot, J. Acribia, Zaragoza España.
- Childs R.E y Bardsley W G. (1975) **The steady state kinetics of peroxidase with 2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) as chromogen**, *Biochem. J.*, 145, 93-103.
- Chiu K. C. y Etzel M.R. (1997) **Fractionation of Lactoperoxidase and lactoferrin from bovine whey using a cation exchange membrane**, *J. Food Sci.*, 62(5), 996-1000.
- De P.K. y Banerjee R.K. (1992) **Purification and characterization of a soluble peroxidase of rat preputial gland: comparison with lactoperoxidase**. *Biochem Biophys. Acta*, 1120, 167-172.
- Deeth H.C. y Tamime A.Y. (1981) **Yogurt: Nutritive and Therapeutic Aspects**, *J. Food Prot.*, 44(1), 78-86.
- Denis F. y Ramet J.P., (1989) **Antibacterial Activity of the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in trypticase soy broth, UHT milk and French soft cheese**, *J. Food Prot.* 52(10), 706-711.
- deWit J.N. y vanHooydonk-A.C.M. (1996) **Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems**. *Neth. Milk Dairy J.*, 50(2), 227-244.
- Dionysius D.A., Grieve P.A. y Vos A.C. (1992) **Studies on the lactoperoxidase system: reaction kinetics and antibacterial activity using two methods for hydrogen peroxide generation**, *J. Appl. Bacteriol.*, 72, 146-153.
- Earnshaw R.G. y Banks J.G.(1989). **A note on the inhibition of *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 in milk by an activated lactoperoxidase system**, *Lett. Appl. Microbiol.*, 8, 203-205.

- Ekstrand B., Mullan W.M.A y Waterhouse A. (1985) **Inhibition of the antibacterial lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system by heat-treated milk**, J. Food Prot., 48(6), 494-498.
- Fox P.F. (1991) **Cap. III, Proteinase**, en Food enzymology, Editor Fox P.F., Elsevier Applied Science, Oxford, U.K.
- Garcia-Garibay .M. (1986) **Yogurt. Aspectos microbiológicos y de elaboración**, Tecnol. Aliment. (Mex)., 21(6): 6-14.
- García G.M., Luna Salazar A. y Casas L.T.(1995) **Antimicrobial effect of the lactoperoxidase system in milk activated by immobilized enzymes**, Food Biotechnol., 9(3), 157-166.
- Gothefors L. y Marklund S. (1975) **Lactoperoxidase activity in human milk and in saliva of newborn infants**, Infect. Immun. 11(6), 1210-1215.
- Gould G.W. (1996) **Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications**. J. Food., Prot. supplement 82-86.
- Goulet J. (1991) **Cap. XII: Leche y productos lácteos fermentados**, en Ciencia y tecnología de la leche editor Amiot J., Editorial Acribia, España.
- Griffiths M.W. (1986). **Use of milk enzymes as indices of heat treatment**. J. Food. Prot. 49(9), 696-705.
- Guha K.C y Roy B.R. (1973) **Enzymic differentiation between curds of heated and raw milk . II Milk peroxidase**, J. Sci. Food Agric., 24, 1-6.
- Haddadin M.S., Ibrahim S:A., y Robinson R.K. (1996) **Preservation of raw milk by activation of the natural lactoperoxidase systems**, Food Cont.. 7(3), 149-152.
- Hill A.R. (1988) **Quality of ultra-high-temperature processed milk**, Food Technol., 42(89), 92-97.
- Hirano R., Hirano M., Oooka M., Nacajima I. y Igoshi K. (1998) **Lactoperoxidase effects on rheological properties of yogurt**, J. Food. Sci. 63(1):35-38.
- Horton B.S. (1995) **Commercial utilization of minor milk components in the health and-food industries**, J. Dairy Sci, 78(11), 2584-2589.
- Kamau D.N. Doores S. y Pruitt K.M (1991) **Activation of the lactoperoxidase**

- **system prior to pasteurization for shelf-life extension of milk.** *Mikchwissenschaft* 46(4), 213-214.
- Limsowtin G. (1992) **Inhibition of starter cultures,** *Aust. J. Dairy Technol.*, 47(7), 100-101.
- López F.R., Villamiel M., Corso N. y Olando A. (1996) **Assessment of the thermal treatment of milk during continuous microwave and conventional heating,** *J. Food Prot.*, 59(8), 889-892.
- Mäkinen K.K. y Tenovuo J. (1982) **Observations on the use of guaiacol and 2,2'-Azino-di(3-Ethylbenzthiazoline-6-sulsonic acid.) as peroxidase substrates.** *Anal. Biochem.* 126, 100-108.
- Martínez C.E., Mendoza P.G., Alacron F.J. y García H.S. (1988). **Reactivation of the lactoperoxidase system during raw milk storage and its effect on the characteristics of pasteurized milk.,** *J. Food Prot.* 51(7), 551-561.
- Moate P.J., Dalley D.E.; Grainger C., Goudy A.; Clarke T., Williams P. y Limsowtin-G. (1996) **The effects of feeding turnips on the concentration of thiocyanate in milk and consequences for cheese making .** *Aust. of Dairy Technol.*, 51(1), 1-5.
- Moldoveanu Z., Tenovuo J., Mestecky J. and Pruitt. (1982). **Human milk peroxidase is derived from milk leukocytes.** *Biochem. Biophys. Acta*, 718, 103-108.
- Nakada M., Dosako S, Hirano R., Oooka M., y Nakajima (1996) **Lactoperoxidase suppressed acid production in yoghurt during storage under refrigeration,** *Int. Dairy J.*, 6(1), 33-42.
- Nichol A.W., Harden T.J., Dass C.R., Angel L. y Louis J.P. (1995). **Self- induced inhibition of grow of *Streptococcus salvarius* subsp. *thermophilus* by activation of the lactoperoxidase system.** *Aust. J. Dairy Technol.* 50(2), 41-46.
- Olivecrona T. y Bengtsson-Olivecrona (1991). **Cap. II, Lipase,** en *Food Enzymology*, Editor Fox P:F., Elsevier Applied Science, Oxford, U.K.
- Pruitt K.M., Kamau D.N., Miller K., Manson R.M. y Rahemtulla F. (1990) **Quantitative, standardized Assays for determining the concentrations of bovine lactoperoxidase, human salivary peroxidase and human myeloperoxidase,** *Anal. Biochem* 191, 278-286

- Ravanis S. y Lewis M.J. (1995) **Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk**, Lett. Appl. Microbiol., 20, 164-167
- Reiter B. (1978) **Review of the progress of dairy science: Antimicrobial systems in milk**, J. Dairy Res., 45, 131-147.
- Reiter B. y Harnulv G. (1984). **Lactoperoxidase antibacterial system: Natural occurrence, biological functions and practical applications**. J Food Prot., 47(9), 724-732.
- Ridley S.C. y Shalo P. (1990). **Farm Application of lactoperoxidase treatment and Evaporative cooling for the intermediate preservation of unprocessed milk in Kenya**. J. Food Prot., 53(7), 592-597.
- Riel R. (1991) **Cap. 1: Composición y estructura fisico-química de la leche**, en Ciencia y tecnología de la leche editor Amiot J., Editorial Acribia, España.
- Roginski, H., Broome M.B. y Hickey M.W. (1984) **Non-Phage inhibition of group N Streptococci in milk . 1. The incidence of inhibition in bulk milk**. The Aust.. J. Dairy Technol. 38, 23-27.
- Santos Moreno A. (1991) **Leche y sus derivados**, Ed. Trillas, México 1991.
- Santos Moreno A. (1992) **Química y Bioquímica de Alimentos**. Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Santos J.A., González C., García L.M.L., García F. M. C., y Otero A. (1994) **Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against *Aeromonas hydrophila* in broth, skim milk and ewes' milk**, Lett. Appl. Microbiol., 19, 161-164.
- Santos, J.A; López D.TM; García F., García L. ML. y Otero A. (1995). **Antibacterial effect of the lactoperoxidase system against *Aeromonas hydrophila* and psychrotrophs during the manufacturing of the Spanish sheep fresh cheese Villalon**. Milchwissenschaft . 50(12), 690-692.
- Sarkar S. y Misra A.K. (1994) **Validity of various microbiological test for assessing quality of raw milk preserved by LP- system**. Indian J. Dairy Sci., 47(6), 505-512.
- Sato K., Dosako S., Nakajima I. y Ido K. (1992) **Effects of ionic strength on thermostability of lactoperoxidase**, Biosci Biotechnol. Biochem., 56(12), 2054-2055

- Sciancalepore V., DeStefano G. y Piacquadio P. (1996) **Influence of mono and divalent cations on thermostability of lactoperoxidase in model systems.** *Milchwissenschaft*, 51(9), 512-514.
- Segel I. (1976) **Biochemical Calculations.** Ed. John Wiley & Sons, USA.
- Shindler J.S. y Bardsley W.G. (1975) **Steady-state kinetics of lactoperoxidase with ABTS as chromogen.** *Biochem. Biophys. Res. Com.* 67(4), 1307-1312.
- Shindler J.S. y Bardsley W.G. (1976) **The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-Azino-di(3-Ethylbenzthiazoline-6-sulsonic acid) as chromogen,** *Biochem. J.*, 145, 93-103
- Siragusa G. y Johnson M. (1989) **Inhibition of *Listeria monocytogenes* grow by the lactoperoxidase-thiocyanate-H₂O₂ antimicrobial system,** *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(11), 2802-2805.
- Stephens S., Harkness R.A y Cockle S.M. (1979) **Lactoperoxidase activity in guinea-pig and saliva: correlation in milk of lactoperoxidase with bactericidal activity against *Escherichia coli*.**, *Br. J. Exp. Path.* 60, 252-258.
- Thomas E. L. y Aune T.M. (1978) **Lactoperoxidase, peroxide, thiocyanate antimicrobial system: correlation of sulfhidril oxidation with Antimicrobial Action,** *Infect Immun.*, 20(2), 456-463.
- Varman A. H. y Sutherland J.P. (1994) **Milk and Milk products .** Ed. Champang & Hall, London.
- Whitaker J.R. (1994) **Principles of Enzymology for the Food Science,** Marcel Dekker, USA.
- Wolfoson L.M. y Sumner S.S. (1993) **Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: A review,** *J. Food Prot.* 56(10), 887-892.
- Zajac M., Gladys J., Skarzynska M., Härnultv G., y Björck L. (1983) **Changes in bacteriological quality of raw milk stabilized by activation of its lactoperoxidase system and storage at different temperatures,** *J. Food Prot.* 46(12), 1065-1068.
- Zapico P., Gaya P., Nuñez M. y Medina M. (1995). **Activity of goats' milk lactoperoxidase system on *Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli* at refrigeration temperatures.** *J. Food Prot.* 58(10) 1136-1138.