APLICACIÓN DEL MÉTODO ENZIMÁTICO PENZYM® EN LA DETERMINACIÓN DE INHIBIDORES EN LA LECHE DE OVEJA

Molina,M.P. ; Altahus,R.L.; Fernandez,N.; Peris, C.; Rodríguez,M.
Departamento de Ciencia Animal - Universidad Politécnica de Valencia - Camino de Vera, 14. Apartado 22012. 46071 Valencia, (España).

INTRODUCCIÓN

La presencia en la leche de sustancias antimicrobianas, especialmente antibióticos, puede tener graves consecuencias tanto desde el punto de vista toxicológico como tecnológico (Moretain, 1996).

En España, la leche de oveja se destina casi exclusivamente a la elaboración de quesos, por lo que resulta necesario controlar la presencia de inhibidores para disminuir los problemas en la fabricación y aquellos relacionados con su posterior transmisión al consumidor.

Durante los últimos años se han desarrollado diferentes métodos de análisis para la detección de inhibidores presentes en la leche (FIL, 1991). En el caso concreto de la leche de oveja, los métodos utilizados son los mismos que los empleados en la leche de vaca (Sischo y Burns, 1993, Seymour *et al.*,1988; Andrew *et al.*, 1997), siendo muy limitados los estudios realizados sobre su evaluación en otras especies (Zeng *et al.*, 1996; Contreras *et al.*, 1997).

Por este motivo, el objetivo del presente trabajo ha sido evaluar la respuesta del método enzimático Penzym® aplicado a la leche de oveja, analizando también el efecto que produce la adición de conservantes y el tiempo de lectura de los resultados.

MATERIAL Y MÉTODOS

1 . Muestras de leche y métodos analíticos.

Se utilizó un grupo de 48 ovejas de la raza Manchega divididas en dos grupos de animales según la fecha del parto. Las muestras de leche procedentes de animales individuales, se recogieron con una frecuencia quincenal, desde los 15 días posteriores al parto hasta el secado.

Cada muestra de leche se fraccionó en 3 alícuotas para estudiar el efecto del conservante (sin conservante, dicromato de potasio y azidiol). Las distintas alícuotas fueron analizadas mediante el método enzimático Penzym®, realizando las lecturas en forma visual a los 15 y 22 minutos, calificándolas como negativos, dudosos y positivos.

2 . Métodos estadístico

Para el estudio estadístico se utilizó el modelo de regresión logística multinomial, mediante el procedimiento LOGISTIC empleando la opción STEPWISE del paquete estadístico SAS® (SAS, 1996). El modelo estadístico fue el siguiente:

$Y_{ijkl} = \mu + C_i + T_j + EL_k + (C*T)_{ij} + (C*EL)_{ik} + (T*EL)_{jk} + \varepsilon_{ijkl}$

Siendo: Y_{ijkl} = variable dependiente; μ = media general; C_i = efecto del conservante; t_j = efecto del tiempo de lectura; EL_k = estado de lactación (n=9); $(C*t)_{ij}$ = interacción

conservante y tiempo de lectura; $(C*EL)_{ik}$ = interacción estado de lactación y conservante; $(t*EL)_{jk}$ = interacción tiempo y tratamiento térmico; ε_{ijkl} = error residual.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la aplicación del modelo de regresión logística multinomial indican un efecto altamente significativo (χ^2 = 70,316) para el agregado del conservante y el tiempo de lectura del método (χ^2 = 45,849), no resultando significativos el efecto del estado de lactación y las interacciones estudiadas.

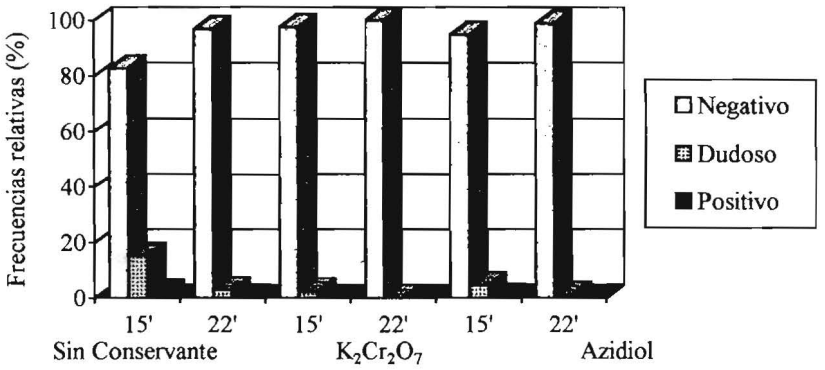
En la Figura 1 se representan las frecuencias relativas de las respuestas del método Penzym® para los conservantes y los tiempos de lecturas utilizados (n= 1119).

Se advierte un aumento significativo en la frecuencia de los casos negativos para muestras conservadas con dicromato de potasio (97,6 %) y azidiol (94,9 %), frente a las que no contienen conservante (82,8 %), cuando se lee a los 15 minutos.

El efecto de la prolongación del tiempo de lectura también resultó significativo, observándose un aumento en la frecuencia de casos negativos en las muestras sin conservante desde un 82,8 % (lecturas a 15') hasta un 96,8 % (lecturas a 22') y una disminución en el porcentaje de resultados dudosos, desde un 15,3 % a un 2,9 %.

El aumento en la frecuencia de casos negativos en la respuesta del método Penzym® al utilizar dicromato de potasio como conservante se podría explicar considerando el poder oxidante que presenta a valores de pH habituales en la leche, ya que podría oxidar al colorante del método, incrementando el número de resultados negativos, lo que equivale a interpretar respuestas como "falsas negativas".

Figura 1. Frecuencias relativas (%) en muestras de leche de oveja con diferentes conservantes y tiempo de lecturas mediante el método Penzym®.



El porcentaje de casos positivos encontrados fue inferior al 9,92 % de casos "falsos positivos" determinados por Andrew *et* al (1997) y al 17% obtenido por Seymour *et* al (1988) en muestras de leche de vaca con el mismo método cuando las lecturas se realizan a los 15', pero superior a los valores hallados por Contreras *et* al (1997) en muestras de leche de cabra, quienes encuentran un solo resultado falso positivo sobre un total de 170 muestras analizadas con el mismo tiempo de lectura.

En la Tabla 1 se indican los valores de selectividad (relación entre el número de casos negativos y el total de muestras analizadas en cada caso), donde se puede observar el incremento en la selectividad debido a la prolongación del tiempo de incubación, así como también un aumento debido al efecto del conservante, que podría deberse al incremento de resultados "falsos positivos".

Tabla 1. Efecto del conservante y tiempo de lectura sobre la selectividad del método Penzym® utilizado con leche de oveja.

Conservante	Tiempo de lectura (minutos)	
	15'	22'
Sin Conservante	82,8%	96,8%
$K_2Cr_2O_7$	97,6%	100 %
Azidiol	94,9 %	98,9 %

CONCLUSIONES

Los factores conservante y tiempo de lectura afectaron significativamente a la respuesta del método enzimático Penzym® al ser utilizado con leche de oveja. Se determinaron frecuencias más elevadas de resultados negativos en las muestras conservadas con dicromato de potasio y azidiol respecto a las que no contenían conservante, lo cual podría atribuirse a una posible interferencia de estos conservantes con el indicador de óxido-reducción que posee el método.

El incremento en el tiempo de lectura de 15 a 22 minutos disminuye la frecuencia de resultados falsos positivos desde un 1,9% (7 muestras) hasta un 0,3 % (1 muestra) cuando no se utiliza conservante y elimina completamente el 0,5 % (2 muestras) de resultados positivos de muestras conservadas con azidiol.

AGRADECIMIENTOS

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

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREW, S.M.; FROBISH, R.A.; PAAPE, M.J.; MATURIN, L.J., 1977. *Journal of Dairy Science*, 80: 3050-3057.

BROUILLET, P., 1994. Meître de la présence dinhibiteurs dans le lait. *Recuil de Médecine Vétérinaire. Spécial Qualité du lait*: 443-455

MORÉTAIN, J.P., 1996. XIII Reunión de técnicos especialistas en control de mamitis y calidad de leche. Pamplona, 25 de octubre1996.

CONTERERAS, A.; PAAPE, M.J.; DI CARLO, A.L.; MILLER, R.H.; RAINARD, P., 1997. *Journal of Dairy Science*, 80: 1113-1118.

FIL-FEDERATION INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1991.Boletín 258, 99p.

SEYMOUR, H.; JONES, G.M.; GILLIARD, M.L., 1988. *Journal of Dairy Science*, 71: 539-544.

SISCHO, W.M., BURNS,C.M., 1993. *Journal of American Veterinary and Medical Association.*, 202: 1249-1254.

ZENG,S.S.; ESCOBAR,E.N.; BROWN-CROWDER,Y., 1996. *Small Ruminant Research*, 21: 155-160.