

EFFECTO DE LA ALIMENTACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA LACTOPEROXIDASA EN VACAS LECHERAS

NAGEL, O.¹, ALTHAUS, R. L.¹, CERUTTI, R.¹,
SCAGLIONE, M. C.¹ BOGGIO, J. C.¹ & MOLINA, M. P.²

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la alimentación sobre los componentes del sistema lactoperoxidasa en leche de vaca. Para ello, se utilizaron muestras de leche procedentes de 211 vacas lecheras clínicamente sanas con recuentos de células somáticas inferiores a las 300.000 cél ml⁻¹. Los animales fueron clasificados en tres grupos según la alimentación. Grupo I: 68 animales alimentados con pasturas naturales de alfalfa (*Medicago sativa*), granos de maíz (*Zea maíz*) con afrechillo (*Triticum aestivum*), Grupo II: 74 vacas alimentadas con granos de maíz (*Zea maíz*), alfalfa (*Medicago sativa*) y granos húmedos de maíz (*Zea maíz*) y Grupo III: 69 animales alimentados con pasturas naturales de alfalfa (*Medicago sativa*), maíz (*Zea maíz*) y sorgo (*Sorghum almun*). Sobre cada muestra de leche se determinó la composición química mediante espectroscopía en el infrarrojo cercano, los recuentos de células somáticas por microscopía de fluorescencia y los niveles de los componentes del sistema lactoperoxidasa por técnicas espectrofotométricas. La media de los valores obtenidos fueron: 1.24 UI ml⁻¹ de lactoperoxidasa, 8.30 mg l⁻¹ de tiocianato y 2.45 mg l⁻¹ de peróxido de hidrógeno. Se observó un efecto significativo de la alimentación sobre los tres componentes del sistema lactoperoxidasa (P < 0.0001). Las muestras de leche del Grupo I presentaron mayor actividad de la enzima lactoperoxidasa (1.46 UI ml⁻¹) que las correspondientes a los Grupos II (1.23 UI ml⁻¹) y Grupo III (1.05 UI ml⁻¹), mientras que la concentración de tiocianato resultó superior en las muestras de leche de los Grupo I (8.98 mg l⁻¹) y Grupo III (9.50 mg l⁻¹) en comparación con el Grupo II (6.57 mg ml⁻¹). Se concluye que los niveles de estos componentes parecen ser insuficientes para activar el sistema lactoperoxidasa.

Palabras clave: lactoperoxidasa, tiocianato, peróxido de hidrógeno, alimentación, vaca lechera.

SUMMARY

Effect of the feeding on lactoperoxidase system components in milking cows.

The objective of the present work was to evaluate the effect of the feeding on the components of the lactoperoxidase system in cow milk. For it, milk samples coming from 211 milking cows clinically healthy, with somatic cell recounts inferior to the 300.000 cél ml⁻¹ were used. The animals

1.- Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. Kreder 2805. (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe.

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

Manuscrito recibido el 10 de febrero de 2005 y aceptado para su publicación el 7 de junio de 2005.

were classified in three groups according to the feeding treatment. Group I: 68 animals fed with natural pastures of alfalfa (*Medicago sativa*), corn grains (*Zea corn*) with afrechillo (*Triticum aestivum*), Group II: 74 cows fed with corn grains (*Zea corn*), alfalfa (*Medicago sativa*) and humid corn grains (*Zea corn*) and Group III: 69 animals fed with natural pastures of alfalfa (*Medicago sativa*), corn (*Zea corn*) and sorghum (*Sorghum almun*). On each sample, milk chemical composition was determined by means of near infrared spectroscopy, somatic cell, counts for fluorescence microscopy and levels of the lactoperoxidase system components for spectroscopic technique. The mean values were: 1.24 UI ml⁻¹ of lactoperoxidase, 8.30 mg l⁻¹ of thiocyanate and 2.45 mg l⁻¹ of hydrogen peroxide. A significant effect ($P < 0.0001$) of the feeding on the three lactoperoxidase system components was observed. Group I milk samples showed lactoperoxidase enzyme activity (1.46 UI ml⁻¹) bigger than those corresponding to the Group II (1.23 UI ml⁻¹) and Group III (1.05 UI ml⁻¹). Thiocyanate concentration was higher in the milk samples of Group I (8.98 mg l⁻¹) and Group III (9.50 mg l⁻¹) than the corresponding for Group II (6.57 mg l⁻¹). It is concluded that the levels of these components seem to be insufficient to activate the lactoperoxidase system.

Key words: lactoperoxidase, thiocyanate, hydrogen peroxide, feeding, milking cow.

INTRODUCCIÓN

La acción antimicrobiana del sistema lactoperoxidasa (SLP) se produce cuando están presentes la enzima lactoperoxidasa (LP), el ión tiocianato (SCN⁻) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), constituyendo un inhibidor natural de la leche con acción antimicrobiana sobre una gran variedad de microorganismos Gram positivos (Kamau *et al.*, 1990; Mickelson, 1979; Zapico *et al.*, 1993, 1995) y Gram negativos (Björck *et al.*, 1975; Earnshaw *et al.*, 1990; Santos *et al.*, 1994; Zapico *et al.*, 1995).

Los productos de la reacción de oxidación del tiocianato en presencia de peróxido de hidrógeno, que es catalizada por la enzima LP, son los iones hipocianato (OSCN⁻), cianosulfuroso (O₂SCN⁻) y cianosulfúrico (O₃SCN⁻) y se consideran inhibidores del desarrollo de los microorganismos (Björck & Claesson, 1979).

La enzima LP es una de las más abundantes de la leche, representando aproximadamente el 1% de las proteínas que posee la leche (Reiter, 1985; Mee, 1994). Esta enzima es inactiva en su estado natural y requiere de

la presencia de SCN⁻ y de H₂O₂ para manifestar su poder inhibitorio.

El SCN⁻ proviene de los glucosinolatos y la detoxificación de glicósidos cianogénicos presentes en los alimentos. Numerosos factores influyen sobre la concentración de los iones SCN⁻ en la leche, entre los que se destaca la alimentación (Wolfson & Summer, 1993).

El tercer componente del SLP es el H₂O₂, que puede formarse en forma endógena a partir de los leucocitos polimorfonucleares (Wit & Van Hooydonk, 1996) y por numerosos microorganismos, tales como lactobacilos, estreptococos y lactococos (Pruitt *et al.*, 1990). También, se puede originar mediante los sistemas generadores de H₂O₂ como la oxidación del ácido ascórbico, la oxidación de la hipoxantina por acción de la enzima xantina oxidasa, o la oxidación aeróbica de manganoso - dependiente de los nucleótidos piridínicos reducidos por peroxidasas (Wolfson & Summer, 1993).

En su estudio sobre la inhibición del desarrollo de microorganismos en la leche, Mee (1994) indica que la adición de peróxido de hidrógeno y tiocianato hasta concentraciones de 9 mg kg⁻¹(H₂O₂) y de 10 mg kg⁻¹ (SCN⁻

) puede utilizarse para preservar la leche cuando no se dispone de facilidades para su almacenamiento en frío. Por su parte, la Federación Internacional de Lechería (FIL, 1988) recomienda la adición de SCN⁻ para obtener una concentración final de 0.18 mM y el agregado de percarbonato de sodio de modo tal de alcanzar una concentración final de H₂O₂ de 0.2-0.3 mM.

Los niveles de los componentes del SLP se ven afectados por numerosos factores, destacándose la especie animal (Pruitt & Reiter, 1985; Wolfson & Summer, 1993), la raza (Zapico *et al.*, 1991), el período de lactancia (Medina *et al.*, 1989, Zapico *et al.*, 1991; Althaus *et al.*, 2001), la estación del año (Nichol *et al.*, 1995), la hora del ordeño (El-Ghandi & Sayed, 1997), los recuentos de células somáticas (Althaus *et al.*, 2000) y el tiempo transcurrido entre la recolección de las muestras y su análisis (Martínez *et al.*, 1988, Stefano *et al.*, 1995; Althaus *et al.*, 2001).

Los estudios tendientes a evaluar el efecto de la alimentación sobre los componentes del SLP en leche son muy escasos (Moate *et al.*, 1996), motivo por el cual, el objetivo de este trabajo fue determinar los niveles del SLP en leche de vaca de raza Holstein sometidas a diferentes dietas y poder establecer de este modo su posible acción antimicrobiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES Y CONDICIONES DEL MUESTREO

En el diseño experimental se utilizó un grupo de 211 vacas de la raza Holstein, clínica-mente sanas que se encontraban en su segunda o tercer lactancia, provenientes del Departamento Las Colonias (Santa Fe, Argentina) ubicada a los 31° 28' de latitud sur, y 60° 55' de longitud oeste, siendo el clima de la región semihúmedo-húmedo,

según la clasificación de Thournthwaite. Las precipitaciones oscilan entre los 652 y 1272 mm anuales, y las temperaturas medias se hallan comprendidas entre 17°C y 19°C, siendo los valores extremos de 6°C en invierno y 40°C en verano.

Los animales fueron clasificados en tres grupos, según la dieta que recibieron:

Grupo I: 68 animales alimentados con pasturas naturales de alfalfa (*Medicago sativa*), granos de maíz (*Zea maíz*) partido con afrechillo (*Triticum aestivum*).

Grupo II: 74 vacas alimentadas con granos de maíz partido (*Zea maíz*), rollos de alfalfa (*Medicago sativa*) y granos húmedo (*Zea maíz*)

Grupo III: 69 animales alimentados con pasturas naturales de alfalfa (*Medicago sativa*), maíz (*Zea maíz*) y sorgo (*sorgum almun*).

Las muestras de leche, una vez recolectadas, fueron conservadas a 4 °C en recipientes plásticos descartables para evitar posibles contaminaciones que pudieran causar errores en los posteriores análisis.

PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Sobre las muestras de leche procedentes del ordeño de la mañana (6.00 horas a.m.) de animales individuales se realizaron las siguientes determinaciones:

- **Actividad de la enzima LP:** Según el método descrito por Pruitt & Kamau (1993), utilizando diluciones 1:10 de las muestras originales. Como reactivo cromóforo se empleó el ácido 2,2' azino bis 3-etil benzilthiazonil-6-sulfónico (ABTS, Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) a un pH = 6.0. Las lecturas de absorbancias se efectuaron a los 3 y 7 minutos con una longitud de onda de 412 nm.

- **Concentración de iones SCN⁻:** Subsecuente a la desproteínización de la leche con

ácido tricloroacético (20% p/v) y extracción de la materia grasa con cloroformo, los niveles del anión tiocianato se determinaron midiendo la absorbancia a 460 nm siguiendo la técnica descrita por Banks & Board (1985)

- **Concentración de H_2O_2** : La concentración de H_2O_2 fue determinada por medición de la absorbancia a 596 nm del producto formado por la peroxidación del leucocristal violeta, (Sigma Chemical Co.), reacción que fue catalizada por la adición de peroxidasa (Hourseradish Peroxidase, Sigma Chemical Co.) a pH = 4.5 en un buffer de ácido acético-acetato de sodio (Mottola *et al.*, 1970).

Para las determinaciones fotométricas se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible (Metrolab 330, Argentina).

- **Composición química**: materia grasa (MG), proteínas (P), lactosa (L), sólidos no grasos (SnoG) y sólidos totales (ST) mediante un equipo Bentley-2000 (Bentley Instruments, Chaska, EEUU) cuyo principio se basa en la espectroscopia de infrarrojo.

- **Recuentos de células somáticas (RCS)**. El recuento de células somáticas se realizó con un instrumento Fossomatic 90 (Foss Electric, Dinamarca).

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Con el propósito de analizar el efecto de la alimentación (A) sobre los niveles del SLP se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA) según el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde: Y_{ij} = variable dependiente, A_i = efecto de la alimentación ($i = 3$) y ε_{ij} = error residual del modelo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los principales parámetros estadísticos de la composición química, descenso crioscópico y recuentos de células somáticas determinados en las muestras de leche de vacas Hosltein se muestran en el Cuadro 1.

De igual forma, en el Cuadro 2 se muestran los principales parámetros estadísticos de los niveles de los componentes del SLP. Se aprecia que tanto el H_2O_2 (88.00 %) como los iones SCN^- (47.11 %) presentaron mayores coeficientes de variación que la enzima LP (29.84 %).

La gran variabilidad observada en la concentración de H_2O_2 se puede atribuir a las numerosas fuentes generadoras de este componente (Pruitt *et al.*, 1990), mientras que las variaciones en los niveles de SCN^- se deben, especialmente, a la diferente alimentación del ganado (Wolfson & Sumner, 1993; Fennema, 1994).

La actividad media de la enzima LP en leche de vaca se encuentra dentro del rango 0.25-3.01 UI ml^{-1} con una media de 1.24 UI ml^{-1} (Shindler *et al.*, 1976, Stephens *et al.*, 1979). En leche de oveja, Medina *et al.* (1989) y Althaus *et al.* (2001) obtienen actividades de la enzima LP similares a los determinados en el presente trabajo (0.140-2.380 UI ml^{-1} y 0.77-12.51 UI ml^{-1} , respectivamente).

Igualmente numerosos autores determinan concentraciones de SCN^- en leche de vaca que se hallan dentro del amplio rango calculado en el presente trabajo. Así, Björck & Claesson (1979), Stephens *et al.* (1979), Moate *et al.* (1996) y Bibi & Bachmann (1997) informan rangos de 3.2-4.6 mg l^{-1} , 1.0-10.0 mg l^{-1} , 10.3-11.3 mg l^{-1} y 6.24-11.80 mg l^{-1} , respectivamente, que comparados con los valores obtenidos en este trabajo indican la validez de nuestros resultados.

La concentración media del H_2O_2 (2.45 mg l^{-1} , Cuadro 2) se halla dentro del rango

Cuadro 1: Composición química, descenso crioscópico y recuentos de células somáticas en leche de vaca de raza Holstein.

Parámetro	Media *	D.S.	C.V.	Rango
Descenso Crioscópico. (° K)	0.552	0.040	7.25	0.288-0.643
Materia Grasa (g %)	3.35	0.82	24.47	1.25-5.72
Proteínas (g %)	3.27	0.33	10.09	2.45-4.29
Lactosa (g %)	4.93	0.26	5.27	3.29-5.49
Sólidos no grasos (g %)	9.01	0.42	4.66	7.92-10.18
Sólidos totales (g %)	12.35	0.95	7.69	9.87-15.03
RCS	112500	82000	72.88	20000-300000
Log RCS	5.0501	4.914	97.30	4.301-5.477

D.S.: desviación standard, C.V.: coeficiente de variación

*Valores medios de las determinaciones realizadas por duplicado de 211 muestras de leche

Cuadro 2: Niveles de los componentes del SLP en leche de vaca de raza Holstein.

Componente	Media *	D.S.	C.V.	Rango
LP (UI ml ⁻¹)	1.24	0.37	29.84	0.25-3.01
SCN ⁻ (mg l ⁻¹)	8.30	3.91	47.11	0.97-31.28
H ₂ O ₂ (mg l ⁻¹)	2.45	3.08	88	0.44-8.57

D.S.: desviación standard, C.V.: coeficiente de variación

* Valores medios de las determinaciones realizadas por duplicado de 211 muestras de leche

2.0-4.0 mg l⁻¹ determinado por Schiffmann *et al.* (1992). Aunque Althaus *et al.* (2001) obtienen niveles mas bajos de peróxido de hidrógeno en leche de oveja de raza Manchega (0.39 mg l⁻¹).

El efecto de la alimentación sobre los niveles de los componentes del SLP presentes en la leche de vaca Holstein se presentan en el Cuadro 3, donde se puede observar además los resultados obtenidos mediante la aplicación del ANOVA.

Resulta difícil poder atribuir las diferencias significativas en las actividades de la enzima LP a los diferentes tipos de alimentación del ganado, ya que otros factores no considerados, como por ejemplo, el período de lactación (Medina *et al.*, 1989; Althaus *et al.*, 2001) o las diferencias individuales

(Medina *et al.*, 1989) podrían ser los responsables de las mismas.

Con respecto a los iones SCN⁻, se debe examinar su marcada dependencia con los alimentos, ya que numerosas semillas tales como la mostaza, el nabo o los rábanos poseen moléculas precursoras que, al ser metabolizadas en el organismo, originan SCN⁻ (Belitz & Grosch, 1992; Scheuer, 1992; Fennema, 1994).

Tanto la degradación enzimática de los glucosinolatos presentes en algunas semillas, como la detoxificación de los glicósidos cianogénicos de numerosos vegetales (sorgo, mijo, frijoles, etc.) producen el ion SCN⁻, entre otros compuestos (Fennema, 1994).

Se puede observar en el Cuadro 3 que las concentraciones de SCN⁻ en leche de vaca

Cuadro 3: Efecto de la alimentación sobre los componentes del SLP en leche de vaca de raza Holstein.

Componente	Alimentación			Valor "F"	Valor "P"
	"A" (n=68)	"B" (n=74)	"C" (n=69)		
LP (UI ml ⁻¹)	1.46 _a ± 0.46	1.23 _b ± 0.23	1.05 _c ± 0.29	12.79	0.0001
SCN ⁻ (mg l ⁻¹)	8.98 _a ± 5.11	6.57 _b ± 2.45	9.50 _a ± 3.17	24.60	0.0001
H ₂ O ₂ (mg l ⁻¹)	2.00 _a ± 0.53	4.08 _b ± 2.56	1.15 _c ± 0.42	385.05	0.0001

A: Pasturas naturales de altaíta y granos de maíz partido con atrechillo

B: Granos de maíz partido y rollos de alfalfa

C: Pasturas naturales de alfalfa, maíz y sorgo

a, b, c: Diferentes subíndices en una misma fila señalan diferencias significativas

Holstein para los diferentes tipos de alimentación se encuentran dentro del rango 6.24-11.80 mg l⁻¹ SCN⁻ determinado en leche de vaca por Bibi & Bachmann (1997). En leche de oveja, Medina *et al.* (1989) y Althaus *et al.* (2001) obtienen rangos similares a los observados en este trabajo (de 0.40-20.60 mg l⁻¹ y 4.71-10.30 mg l⁻¹, respectivamente).

Los mayores niveles del ion SCN⁻ (9.50 mg l⁻¹) se observaron en las muestras de leche procedentes de animales alimentados con granos de sorgo (grupo «C»). Hay que destacar que este alimento significa un aporte considerable de glicósidos cianogénicos, moléculas precursoras de los iones tiocianato presentes en la leche (Scheuer, 1992).

El amplio rango determinado para la concentración de H₂O₂ (1.15-4.08 mg l⁻¹) en leche de vacas Holstein no se puede atribuir exclusivamente a la alimentación, debido a los diversos mecanismos generadores de este componente, como la oxidación del ácido ascórbico, la oxidación de la hipoxantina por acción de la xantina oxidasa, la oxidación de la glucosa mediante la glucosa oxidasa o en forma aeróbica a partir de los nucleótidos piridínicos reducidos por acción de las peroxidases (Wolfson & Summer, 1993). Tampoco se puede dejar de mencionar la generación endógena de este componente a partir de numerosos microorganismos, tales como lactobacilos, estreptococos y lactoco-

cos (Pruitt *et al.*, 1990).

En resumen, los valores normales de SCN⁻ y H₂O₂ encontrados en la leche de vacas Holstein para los diferentes tipo alimentación (Cuadro 3) resultan insuficientes para lograr un efecto antimicrobiano necesario para la preservación de la leche, ya que la activación del SLP se consigue cuando la concentración de SCN⁻ está comprendida entre 10 y 15 mg l⁻¹ y la de H₂O₂ es de aproximadamente 9 mg l⁻¹ (Medina *et al.*, 1989; Zapico *et al.*, 1991; Mee, 1994; Santos *et al.*, 1994).

CONCLUSIONES

La concentración de los componentes del SLP⁻ en leche de vaca de raza Holstein fue 1.24 ± 0.37 UI ml⁻¹ para la enzima LP, 8.30 ± 3.91 mg l⁻¹ para el ion SCN⁻ y 2.45 ± 3.08 mg l⁻¹ para el H₂O₂. La alimentación afectó en forma significativa (P < 0.0001) a los niveles de LP, SCN⁻ y H₂O₂ en las muestras de leche analizadas.

Sin embargo, se concluye que las concentraciones medias de H₂O₂ (2.00 mg l⁻¹, 4.08 mg l⁻¹ y 1.15 mg l⁻¹) y SCN⁻ (8.98 mg l⁻¹, 6.57 mg l⁻¹ y 9.50 mg l⁻¹) determinadas en leche de vaca sometidas a diferentes tipos de alimentación, resultan insuficientes para activar al SLP, por lo que no podría ejercer su

acción antimicrobiano en forma natural.

AGRADECIMIENTO

Trabajo realizado con fondos provenientes de la Universidad Nacional del Litoral, a través del Programa de Curso de Acción para la Investigación y el Desarrollo (CAI + D'02/04, Proyecto 0094-0716-024-164) de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Litoral.

BIBLIOGRAFÍA

- ALTHAUS, R.; P. MOLINA; A. MARTÍ; N. FERNÁNDEZ; M. RODRÍGUEZ & C. PERIS.** 2000. Relación entre RCS y componentes del sistema lactoperoxidasa en leche de oveja in Mamitis y Calidad de Leche. Diego Marin Librero Editor S. A., Murcia, España.
- ALTHAUS, R.; P. MOLINA; M. RODRÍGUEZ & N. FERNÁNDEZ.** 2001. Lactoperoxidase system in dairy ewe milk. *J. Dairy Sci.* 84: 1829-1835.
- BANKS, J. G. & R. G. BOARD.** 1985. Preservation by the lactoperoxidase system (LP-S) of the contaminated infant milk formula. *Letters in Applied Microbiology.* 1: 81-85.
- BELITZ, H. D. & W. GROSCH.** 1992. Química de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza. 2da Edición. ISBN N° 84-200-0835-4.
- BIBI, W. & M. R. BACHMANN.** 1997. The rate of thiocyanate in the lactating bovine. *Milchwissenschaft.* 52: 8-10.
- BJÖRCK, L.; C. G. ROSEN; V. MARSHALL & B. REITER.** 1975. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against pseudomonas and other Gram negative bacteria. *Appl. Microbiol.* 30: 199-204.
- BJÖRCK, L. & O. CLAESSEN.** 1980. Correlation between concentration of hypothiocyanate and antibacterial effect of the lactoperoxidase system. *J. Dairy Sci.* 63: 919-922.
- EARNSHAW, R. G.; J. G. BANKS; C. FRANCOTTE & D. DEFRISE.** 1990. Inhibition of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in an infant milk formula by activated lactoperoxidase system. *J. Food Prot.* 53: 170-172.
- EL-GHANI, S. A. & A. F. SAYED.** 1997. Natural thiocyanate content and optimum conditions for activation of lactoperoxidase system in raw buffalo milk. *Egyptian J. Dairy Sci.* 25: 241 – 252.
- FENNEMA, O. R.** 1994. Química de los alimentos. De. Acribia (Zaragoza). 2da Edición. ISBN N° 84-200-0733-1.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF).** 1988. Code of practice for the preservation of raw milk by the lactoperoxidase system *Bull of IDF.* N° 234. Brussels. Belgium.
- KAMAU, D. N.; S. DOORES & K. M. PRUITT.** 1990. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk. *J. Food Prot.* 53: 1010-1014.
- MARTÍNEZ, C. E.; F. J. MENDOZA & H. S. ALARCON y GARCIA.** 1988. Reactivation of the lactoperoxidase system during raw milk storage and its effect on the characteristics of pasteurized milk. *J. Food Prot.* 51: 558-561.
- MEE, J. F.** 1994. The nutraceutical properties of milk. *Irish Vet. J.* 47: 172-174.
- MEDINA, M.; P. GAYA & M. NUÑEZ.** 1989. The lactoperoxidase system in ewe's milk: levels of lactoperoxidase and thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology.* 8: 147-149.
- MICKELSON, M. N.** 1979. Antibacterial action of lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide on *Streptococcus agalactiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 821-826.

- MOATE, P. J.; D. E. DALLEY; C. GRAINGER; A. GOUDY; T. CLARKE; P. WILLIAMS & G. LIMSOWTIN.** 1996. The effect of feeding turnips on the concentration of thiocyanate in milk and consequences for cheese making. *Australian J. Dairy Technology*. 51 (1): 1-5.
- MOTTOLA, H.; B. E. SIMPSON & G. GORIN.** 1970. Absorption determination of hydrogen peroxide in submicrogram amounts with leuco crystal violet and peroxidase as catalyst. *Anal. Chem.* 42 (3): 410-411.
- NICHOL, A. W.; T. J. HARDER; C. R. DASS; L. ANGEL & J. P. LOUIS.** 1995. Self induced inhibition of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by activation of the lactoperoxidase system. *Australian J. Dairy Technology*. 50 (2): 41-46.
- PRUITT, K. M.; D. N. KAMAU; K. MILLER; B. MANSSON-RAHEMTULLA & F. RAHEMTULLA.** 1990. Quantitative, standardized assays for determining the concentrations of bovine lactoperoxidase, human salivary peroxidase, and human myelo-peroxidase. *Anal. Biochem.* 191: 278-286.
- PRUITT, K. M. & B. REITER.** 1985. Biochemistry of peroxidase system: antimicrobial effect. Pages 143-178 in *The lactoperoxidase system: chemistry and biological significance*. K. M. Pruitt and J. O. Tenovuo, ed. Immunol. Ser. Vol 27. Marcel Dekker Inc. New York, N.Y.
- PRUITT, K. M. & D. N. KAMAU.** 1993. Quantitative analysis of bovine lactoperoxidase system components and of the effects of the activated system on bacterial growth and survival. *FIL Boletín*. 283, 72-86.
- REITER, B.** 1985. The lactoperoxidase system of bovine milk. Pages 123-141 in *The lactoperoxidase system: chemistry and biological significance*. K. M. Pruitt and J. O. Tenovuo, ed. Immunol. Ser. Vol 27. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
- SANTOS, J. A.; T. M. LÓPEZ-DÍAZ; M. C. GARCÍA-FERNÁNDEZ; M. L. GARCÍA-LÓPEZ & A. OTERO.** 1994. Antibacterial effect of the lactoperoxidase system against *Aeromonas hydrophila* and psychrotrophs during the manufacturing of the Spanish sheep fresh cheese Villalón. *Milchwissenschaft*. 50: 690-692.
- SCHEUER, P. J.** 1992. Isocyanides and cyanides as natural products. *Acc. Chem. Res.* 25 (10): 433-439.
- SCHIFFMANN, A.; P. SCHÜTZ & H. WIESNER.** 1992. False negative and positive results in testing for inhibitory substances in milk. Factors influencing the brilliant black reduction test (BRTÖ). *Milchwissenschaft*. 47: 770-772.
- SHINDLER, J. S.; R. E. HILDS & W. G. BARDSLEY.** 1976. Peroxidase from human cervical mucus. The isolation and characterization. *Eur. J. Biochem.* 65: 325-331.
- STEFANO, G.; P. PIACQUADIO; V. SCIANCALÉPORE & G. DE STEFANO.** 1995. Effect of activation of the lactoperoxidase system on acid production in milk during storage at refrigeration temperatures. *Latte*. 20: 1128-1131.
- STEPHENS, S.; R. A. HARKNESS & M. COCKLE.** 1979. Lactoperoxidase activity in Guinea pig milk and saliva: correlation in milk of lactoperoxidase with bactericidal activity against *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* 60: 252-258.
- WIT, J. N. & A. C. VAN HOOYDONK.** 1996. Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. *Neth. Milk Dairy J.* 50: 227-244.
- WOLFSON, L. M. & S. A. SUMNER.** 1993. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: A review. *J. Food Prot.* 56: 887-892.

- ZAPICO, P.; P. GAYA; M. DE PAZ; M. NUÑEZ & M. MEDINA.** 1991. Influence of breed, animal and days of lactation on lactoperoxidase system components in goat milk, *J. Dairy Sci.* 74: 783-787.
- ZAPICO, P.; P. GAYA; M. NUÑEZ & M. MEDINA.** 1993. Goat's milk lactoperoxidase system against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 56: 988-990.
- ZAPICO, P.; P. GAYA; M. NUÑEZ & M. MEDINA.** 1995. Activity of Goat's milk lactoperoxidase system on *Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli* at refrigeration temperatures. *J. Food Prot.* 58: 1136-1138.