

Departament de Genètica i Microbiologia

Facultat de Biociències

Universitat Autònoma de Barcelona

“Caracterització microbiològica i enzimàtica de la llet d’euga gestant. Avaluació de les propietats probiòtiques, antimicrobianes i preservadores”

Tesi doctoral dirigida per:
Dra. Maria dels Àngels Calvo i Torras

Memòria presentada per a optar al Grau de Doctor

GISELA GIRMÉ VILA

2015

AGRAÏMENTS

Abans d'iniciar aquest breu apartat desitjaria fer constar l'orgull que per mi ha suposat poder dedicar aquests últims quatre anys a optar a al que és el darrer nivell acadèmic, el grau de Doctor. És per això que vull agrair aquesta Tesi doctoral en primer lloc a la meva directora, la Dra. M^a Àngels Calvo Torras. La seva dedicació al món de la ciència no té límits, transmetent la seva passió per la feina a tot el qui l'envolta. Moltes gràcies de tot cor per brindar-me aquesta oportunitat i per guiar-me en tot moment. Seguidament agrair aquest treball al Departament de Genètica i Microbiologia de la Facultat de Biociències de la Universitat Autònoma de Barcelona per acollir-me en el seu programa de doctorat, en especial al Dr. Jordi Mas Gordi, coordinador d'estudis.

Voldria continuar agraint aquest treball als meus pares, Àngel i Dolors. Per tot l'esforç que han fet durant tota la meua vida i per la seva dedicació al meu aprenentatge. Per estar sempre al meu costat, en els moments bons i en els no tan bons, perquè el que sóc és el fruit del seu compromís. També amb nostàlgia a la meua àvia Consol, en pau descansi, de qui vaig aprendre les coses més importants: les que s'aprenen de petit.

Gràcies, molt especialment, a l'Eloi, la meua parella, amic, confident. Per acompanyar-me al llarg d'aquest camí, pels seus consells i la seva estimació.

Vull agrair també especialment aquesta tesi a la Mercè Olivé, així com a en Juti i la Lídia (Equaid). Gràcies per introduir-me al món de les eugues, per facilitar-me les mostres de llet, pel vostre compromís amb la investigació, i per estimar-vos tant els animals. Sense vosaltres aquest projecte no hauria estat possible.

Seguidament vull donar les gràcies a la meua família científica, que és molt gran. Vull començar amb els meus companys del Grup de Recerca en Microbiologia Aplicada i Medi Ambiental, del Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals de la Facultat de Veterinària, especialment l'ànima del nostre laboratori: el Leo. Vull continuar amb tots aquells que estan realitzant les seves tesis, tesines, "postdocs", finalitzats o no: Lucía, Rodrigo, Brian, Carlos, Diana, Graciela, Nívia. Per aquells que van fer pràctiques i vénen "perquè ens troben a faltar": Quim, Rut, Núria, Marta, Marc, Nereida, Xavi, Laura, Àngel, Joan. Per tots els alumnes del programa ARGÓ o similars, que van venir

a fer els seus treballs de recerca i continuen venint sempre que poden: Montse, Eduard, Àlex, Judit, Judith, Laura, Maria, Arantxa, Aníbal. A tots vosaltres us desitjo un gran futur acadèmic i professional.

Gràcies a tot el personal que en algun moment ha ajudat a la realització d'aquesta tesi, molt especialment als nostres veïns de la unitat de Malalties Infeccioses i al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular.

No em vull oblidar dels meus amics de tota la vida, els quals m'han vist créixer, i als quals intento no perdre de vista, encara que alguns són a països llunyans. Molt especialment vull agrair la seva amistat i ajuda a la meva companya de carrera Anabel. També amb molt d'afecte a l'Ivan, als Oriols, la Núria, la Bea i en Fran. Tampoc vull oblidar aquells amics que vaig anar fent al llarg de la carrera i el màster, especialment en Jofre, en Jordi, la Diana, la Mar i la Maria José.

Ja acabant, vull agrair aquest treball a tots els professors que, al llarg dels anys, han anat forjant el meu interès per la ciència, en especial a la Mercè i a en Manolo, de qui recordo haver après el què suposa fer una tesi.

Per últim, i no per això menys important, vull donar les gràcies a les eugues Jade i Jaine, la llet de les quals ha servit per a completar gran part d'aquesta tesi.

ABREVIACIONS EMPRADES

µL: Microlitre.

% p/v: Percentatge massa-volum.

ALA: *Alpha linolenic acid*. Àcid α-linolènic.

B.O.E.: Butlletí Oficial de l'Estat.

BAL: Bacteris àcid làctics.

BP: *Baird Parker Agar*. Agar de cultiu *Baird Parker*.

BSH: *Bile salt hydrolase*. Hidrolasa de salts biliars.

Ca: Calci

CE: Comunitat Europea.

CEE: Comunitat Econòmica Europea.

CHD: *Coronary heart disease*. Malaltia cardíaca coronària.

CMT: *California mastitis test*.

CO₂: Diòxid de carboni.

COS: *Columbia agar + 5% sheep blood*. Agar Columbia + 5% de sang de xai.

DHA: *Docosahexaenoic acid*. Àcid docosahexaenoic.

E. durans: *Enterococcus durans*.

E. faecium: *Enterococcus faecium*.

EFSA: *European Food Safety Authority*. Autoritat Europea de Seguretat Alimentària.

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. Comitè Europeu de Proves de susceptibilitat antimicrobiana.

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*. Assaig d'immunoabsorció lligat a enzims.

EPA: *Eicosapentaenoic acid*. Àcid eicosapentaenoic.

et al.: *Et alii*. I altres.

etc.: etcètera.

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Organització de les Nacions Unides per a l'Agricultura i l'Alimentació.

FEEDAP: *Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed*. Comissió Tècnica d'Additius i Productes o Substàncies emprades en l'Alimentació Animal.

FEFANA: *EU Feed Additives and Premixtures Association*. Associació d'Additius i Premescles per a l'Alimentació Animal Europea.

GI: gastrointestinal.

GOT: Glutamat-oxalacetat transaminasa.

GPT: Glutàmic-pirúvic transaminasa.

GRAS: *Generally Regarded as Safe Probiotics*. Probiòtics generalment considerats com a segurs.

h: hores

H₂O₂: Peròxid d'hidrogen.

HDL: *High-density lipoprotein*. Lipoproteïna d'alta densitat.

HPLC: *High performance liquid chromatography*. Cromatografia líquida d'alta resolució.

Ig: Immunoglobulina.

L. brevis: *Lactobacillus brevis*.

L. lactis: *Lactococcus lactis*.

L. plantarum: *Lactobacillus plantarum*.

LA: *Linoleic acid*. Àcid linoleic.

LAP: Leucina aminopeptidasa.

LCPUFA: *Long-chain polyunsaturated fatty acids*. Àcids grassos poliinsaturats de cadena llarga.

LDH: *Lactate dehydrogenase*. Àcid làctic deshidrogenasa.

LDL: *Low-density lipoprotein*. Lipoproteïna de baixa densitat.

log: logaritme

LPL: Lipoproteïna lipasa.

M: Molar

mbar: Mil·libar.

MC: *MacConkey Agar*. Agar de cultiu *MacConkey*.

MIC: *minimal inhibitory concentration*. Concentració mínima inhibidòria.

mL: Mil·lilitre.

MRS: *Man Rogosa Sharpe Agar*. Agar de cultiu *Man Rogosa Sharpe*.

MRSB: *Man Rogosa Sharpe Broth*. Brou de cultiu *Man Rogosa Sharpe*.

MS: matèria seca.

NaCl: Clorur de sodi.

NK: *Natural killer*. Cèl·lules assassines naturals.

nm: nanòmetre.

Nmol: Nanomol.

NPN: *Non proteic nitrogen*. Nitrògen no proteic.

O₂: Oxigen.

O₂⁻: Superòxid.

°C: Graus Celsius.

OH⁻: Radicals hidroxil.

OMS: Organització Mundial de la Salut.

PBS: *Phosphate Buffered Saline*. Tampó fosfat salí.

PMN: Polimorfonuclear.

PUFA: *Polyunsaturated fatty acids*. Àcids grassos poliinsaturats.

Ref: Referència.

RNI: *Recommended nutrient intake*. Ingesta de nutrients recomanada.

S.A.: Societat anònima.

S.A.S.: Societat per accions simplificada.

S.L.: Societat limitada.

S: *Sabouraud Dextrose Agar*. Agar de cultiu *Sabouraud*.

SAU: Societat anònima unipersonal.

EUA: Estats Units d'Amèrica.

sb.: Subespècie

SCC: *Somatic cell count*. Recòmpte de cèl·lules somàtiques.

SFA: *saturated fatty acids*. Àcids grassos saturats.

sp./spp.: Espècie/ Espècies

SPS: *Sulfite Polymixyn Sulfadiazine Agar*. Agar de cultiu sulfít polimixina sulfadiazina.

TGI: Tracte gastrointestinal.

TMB: Tetrametilbenzidina.

TSA: *Tryptone Soy Agar*. Agar de cultiu triptona soja.

TSN: *Trypticase Sulfite Neomycin Agar*. Agar de cultiu tripticasa sulfít neomicina.

UFC: Unitat formadora de colònia.

UHT: *Ultra High Temperature*. Uperització o ultrapasteurització.

var.: Varietat.

VI: Valor d'inhibició

γ-GGT: *Gamma-glutamyl transpeptidase*. Gamma-glutamilttransferasa.

ÍNDEX

RESUM.....	Pàgina 9
ABSTRACT.....	Pàgina 10
INTRODUCCIÓ.....	Pàgina 13
1. Generalitats sobre la llet d'euga.....	Pàgina 15
1.1. Definició.....	Pàgina 15
1.2. Producció i consum.....	Pàgina 15
1.3. Formats de presentació i derivats.....	Pàgina 17
2. Composició de la llet d'euga.....	Pàgina 20
2.1. Característiques generals.....	Pàgina 20
2.2. Comparativa amb altres espècies.....	Pàgina 21
2.3. Composició dels diferents principis immediats.....	Pàgina 23
2.3.1. Composició lipídica.....	Pàgina 23
2.3.1.1. El glòbul gras.....	Pàgina 23
2.3.1.2. Els triglicèrids i els àcids grassos.....	Pàgina 23
2.3.2. Els fosfolípids i els esterols.....	Pàgina 25
2.3.3. Composició proteica.....	Pàgina 25
2.3.4. Els hidrats de carboni.....	Pàgina 26
2.3.5. Les vitamines.....	Pàgina 26
2.3.6. Les cendres.....	Pàgina 27
3. Qualitat de la llet d'euga.....	Pàgina 28
3.1. Qualitat del calostre.....	Pàgina 28
3.2. Llet d'euga com a substitutiu de la llet de vaca en alimentació humana.....	Pàgina 29
3.3. Qualitat microbiològica.....	Pàgina 30
3.4. Factors que modifiquen la qualitat de la llet d'euga.....	Pàgina 30
3.5. Variacions de la llet d'euga durant la lactació.....	Pàgina 32
4. Propietats de la llet d'euga.....	Pàgina 35
5. Microbiologia de la llet d'euga.....	Pàgina 37
5.1. Principals fonts de microorganismes a la llet.....	Pàgina 37
5.1.1. Microorganismes de l'interior del braguer.....	Pàgina 37

5.1.2. Microorganismes de l'exterior del braguer.....	Pàgina 38
5.1.3. Microorganismes procedents del maneig i l'equip d'emmagatzematge.....	Pàgina 39
5.2. Microbiota de la llet d'euga.....	Pàgina 40
6. Bacteris àcid làctics. Probiòtics.	Pàgina 43
6.1. Els bacteris àcid làctics.....	Pàgina 43
6.2. Probiòtics.....	Pàgina 44
6.2.1. Definició i interès.....	Pàgina 44
6.2.2. Mecanisme d'acció	Pàgina 45
6.2.3. Seguretat de les soques probiòtiques.....	Pàgina 46
6.2.4. Taxonomia dels microorganismes probiòtics.....	Pàgina 47
7. Conservació de soques de bacteris àcid làctics.....	Pàgina 48
7.1. El paper dels BAL en l'alimentació: els aliments funcionals.....	Pàgina 48
7.2. La liofilització i l'ús de substàncies protectores.....	Pàgina 49
8. Activitat enzimàtica de la llet d'euga.....	Pàgina 53
8.1. Els components bioactius de la llet d'euga.....	Pàgina 53
8.2. Els enzims de la llet d'euga.....	Pàgina 55
8.2.1. Lisozim.....	Pàgina 55
8.2.2. Lipases.....	Pàgina 56
8.2.3. Esterases.....	Pàgina 56
8.2.4. Plasmina.....	Pàgina 56
8.2.5. Deshidrogenasa.....	Pàgina 57
8.2.6. Aminotransferases.....	Pàgina 57
8.3. Tècniques de mesura dels enzims de la llet.....	Pàgina 58
9. Activitat antimicrobiana dels bacteris àcid làctics.....	Pàgina 59
9.1. Àcids orgànics.....	Pàgina 59
9.2. El peròxid d'hidrogen.....	Pàgina 60
9.3. El diòxid de carboni.....	Pàgina 61
9.4. El diacetil.....	Pàgina 62
9.5. Les bacteriocines.....	Pàgina 62
9.6. Altres substàncies antimicrobianes produïdes pels BAL.....	Pàgina 63
10. Legislació de la llet d'euga. Disposicions legals.....	Pàgina 65
10.1. Disposicions legals.....	Pàgina 65
10.1.1. Disposicions comunitàries de directa aplicació.....	Pàgina 66
10.1.2. Disposicions nacionals.....	Pàgina 66

10.2. Especificacions microbiològiques.....	Pàgina 67
10.3. Tractaments tèrmics.....	Pàgina 68
10.3.1. Pasteurització.....	Pàgina 69
10.3.2. <i>Ultra High Temperature</i> (UHT).....	Pàgina 69
OBJECTIUS I PLA DE TREBALL.....	Pàgina 71
1. Objectius.....	Pàgina 73
2. Pla de treball.....	Pàgina 75
MATERIALS I MÈTODES.....	Pàgina 77
1. Tècnica de mostreig.....	Pàgina 79
1.1. Origen de les mostres.....	Pàgina 79
1.2. Obtenció de les mostres.....	Pàgina 81
2. Tècniques de caracterització microbiològica de la llet d'euga.....	Pàgina 83
2.1. Processament de les mostres.....	Pàgina 83
2.1.1. Material necessari	Pàgina 83
2.1.2. Metodologia	Pàgina 84
2.1.2.1. Sembra i incubació de les llets.....	Pàgina 84
2.1.2.2. Aïllament de les colònies.....	Pàgina 85
2.2. Identificació de cultius I. Morfologia.....	Pàgina 87
2.2.1. Característiques macroscòpiques.....	Pàgina 87
2.2.2. Característiques microscòpiques.....	Pàgina 87
2.2.2.1. Tinció de Gram.....	Pàgina 87
2.2.2.1.1. Fonament.....	Pàgina 87
2.2.2.1.2. Material necessari.....	Pàgina 88
2.2.2.1.3. Tècnica i interpretació.....	Pàgina 89
2.2.2.2. Tinció d'espores.....	Pàgina 91
2.2.2.2.1. Fonament.....	Pàgina 91
2.2.2.2.2. Material necessari.....	Pàgina 91
2.2.2.2.3. Tècnica i interpretació.....	Pàgina 92
2.3. Identificació de cultius II. Proves bioquímiques bàsiques.....	Pàgina 93
2.3.1. Prova de la catalasa.....	Pàgina 93
2.3.1.1. Fonament.....	Pàgina 93
2.3.1.2. Material necessari.....	Pàgina 93

2.3.1.3. Tècnica i interpretació.....	Pàgina 93
2.3.2. Activitat hemolítica.....	Pàgina 94
2.3.2.1. Fonament.....	Pàgina 94
2.3.2.2. Tècnica i interpretació.....	Pàgina 94
2.3.3. Identificació a nivell d'espècie mitjançant proves bioquímiques.....	Pàgina 95
2.3.3.1. <i>Kit</i> API 50 CH.....	Pàgina 95
2.3.3.1.1. Fonament.....	Pàgina 95
2.3.3.1.2. Material necessari.....	Pàgina 96
2.3.3.1.3. Metodologia.....	Pàgina 96
2.3.3.2. <i>Kit</i> API 20 E.....	Pàgina 98
2.3.3.2.1. Fonament.....	Pàgina 98
2.3.3.2.2. Material necessari.....	Pàgina 98
2.3.3.2.3. Metodologia.....	Pàgina 99
2.3.3.3. <i>Kit</i> API Coryne.....	Pàgina 100
2.3.3.3.1. Fonament.....	Pàgina 100
2.3.3.3.2. Material necessari.....	Pàgina 101
2.3.3.3.3. Metodologia.....	Pàgina 101
2.3.3.4. <i>Kit</i> API Strep.....	Pàgina 103
2.3.3.4.1. Fonament.....	Pàgina 103
2.3.3.4.2. Material necessari.....	Pàgina 103
2.3.3.4.3. Metodologia.....	Pàgina 104
2.4. Conservació de les soques aïllades.....	Pàgina 105
2.4.1. Crioconservació.....	Pàgina 106
2.4.1.1. Fonament.....	Pàgina 106
2.4.1.2. Material necessari.....	Pàgina 106
2.4.1.3. Metodologia.....	Pàgina 106
2.4.2. Liofilització.....	Pàgina 107
2.4.2.1. Fonament.....	Pàgina 107
2.4.2.2. Material necessari.....	Pàgina 108
2.4.2.3. Metodologia.....	Pàgina 108
3. Tècniques de caracterització enzimàtica de la llet d'euga.....	Pàgina 110
3.1. Processament de les mostres.....	Pàgina 110
3.1.1. <i>Kit</i> API ZYM®.....	Pàgina 110
3.1.1.1. Fonament.....	Pàgina 110

3.1.1.2.	Material necessari.....	Pàgina 111
3.1.1.3.	Metodologia.....	Pàgina 111
4.	Avaluació del potencial probiòtic de bacteris àcid làctics equins.....	Pàgina 114
4.1.	Característiques macroscòpiques i microscòpiques dels cultius.....	Pàgina 114
4.1.1.	Característiques macroscòpiques.....	Pàgina 114
4.1.2.	Característiques microscòpiques.....	Pàgina 115
4.2.	Proves bioquímiques bàsiques.....	Pàgina 115
4.3.	Avaluació de la seguretat de les soques probiòtiques.....	Pàgina 115
4.3.1.	Anàlisi de sensibilitat als antibiòtics.....	Pàgina 115
4.3.1.1.	Fonament.....	Pàgina 115
4.3.1.2.	Material necessari.....	Pàgina 115
4.3.1.3.	Metodologia.....	Pàgina 117
4.3.1.3.1.	Primer <i>screening</i> : Mètode de difusió en disc.....	Pàgina 117
4.3.1.3.2.	Segon <i>screening</i> : Avaluació de la concentració mínima inhibidora (MIC) en brou de cultiu.....	Pàgina 119
4.3.1.3.3.	Tercer <i>screening</i> : Avaluació de la concentració mínima inhibidora (MIC) en placa de cultiu.....	Pàgina 119
4.3.2.	Determinació de la producció de toxines i capacitat hemolítica.....	Pàgina 120
4.4.	Avaluació de la resistència a les condicions gastrointestinals.....	Pàgina 120
4.4.1.	Fonament.....	Pàgina 120
4.4.2.	Material necessari.....	Pàgina 120
4.4.3.	Metodologia.....	Pàgina 121
5.	Detecció de la producció de substàncies antimicrobianes.....	Pàgina 123
5.1.	Mètode de difusió en agar.....	Pàgina 123
5.1.1.	Fonament.....	Pàgina 123
5.1.2.	Soques i compostos en estudi.....	Pàgina 124
5.1.3.	Material necessari.....	Pàgina 125
5.1.4.	Metodologia.....	Pàgina 125
5.1.4.1.	Preparació de les soques i compostos.....	Pàgina 125
5.1.4.2.	Realització de l'assaig de difusió.....	Pàgina 126
5.2.	Avaluació de la formació de peròxid d'hidrogen.....	Pàgina 127
5.2.1.	Fonament.....	Pàgina 127
5.2.2.	Material necessari.....	Pàgina 128
5.2.3.	Metodologia.....	Pàgina 128

6. Avaluació de la llet d'euga com a crioprotector.....	Pàgina 129
6.1. Descripció del mètode.....	Pàgina 129
6.1.1. Fonament.....	Pàgina 129
6.1.2. Cultius bacterians seleccionats.....	Pàgina 129
6.1.3. Medi de suspensió i rang de concentracions.....	Pàgina 130
6.1.4. Material necessari.....	Pàgina 130
6.1.5. Metodologia.....	Pàgina 131
6.2. Determinació de la viabilitat dels microorganismes.....	Pàgina 133
6.2.1. Determinació de la viabilitat pre-liofilització.....	Pàgina 133
6.2.2. Determinació de la viabilitat post-liofilització.....	Pàgina 133
6.2.3. Determinació de la conservació de la viabilitat al llarg del temps.....	Pàgina 134
RESULTATS.....	Pàgina 135
1. Caracterització microbiològica de la llet d'euga al llarg de la gestació.....	Pàgina 137
1.1. Recomptes microbiològics totals de les llets de dues eugues al llarg de la gestació.....	Pàgina 137
1.1.1. Recomptes microbiològics d'Euga 1 (Jade)	Pàgina 137
1.1.2. Recomptes microbiològics d'Euga 2 (Jaine).....	Pàgina 138
1.1.3. Figures dels recomptes microbiològics de la llet d'Euga 1 i d'Euga 2.....	Pàgina 140
1.1.4. Anàlisi estadístic dels recomptes microbiològics.....	Pàgina 141
1.2. Recomptes microbiològics totals de la llet d'Euga 1 en període no gestant.....	Pàgina 142
1.3. Resultats dels aïllaments i caracteritzacions de les colònies obtingudes.....	Pàgina 143
1.4. Identificacions a nivell d'espècie de les soques d'interès.....	Pàgina 145
2. Caracterització enzimàtica de la llet d'euga al llarg de la gestació.....	Pàgina 146
2.1. Resultats de les activitats enzimàtiques detectades en la llet d'euga mitjançant API ZYM [®]	Pàgina 146
2.1.1. Taules activitats enzimàtiques d'Euga 1 i d'Euga 2.....	Pàgina 146
2.1.2. Figures de les activitats enzimàtiques totals.....	Pàgina 149
2.1.3. Figures de les activitats de cadascun dels enzims.....	Pàgina 150
2.2. Resultats de les activitats enzimàtiques detectades en la llet d'altres espècies.....	Pàgina 156
2.2.1. Activitat enzimàtica de la llet de truja.....	Pàgina 156
2.2.2. Activitat enzimàtica de la llet de vaca.....	Pàgina 157
3. Potencial probiòtic dels bacteris àcid làctics de la llet d'euga.....	Pàgina 158

3.1. Resultats de la selecció de soques BAL potencialment probiòtiques.....	Pàgina 158
3.1.1. Resum de les principals característiques de les soques pre-seleccionades.....	Pàgina 158
3.2. Resultats de l'avaluació de la seguretat de les soques pre-seleccionades.....	Pàgina 159
3.2.1. Anàlisi de la sensibilitat als antibiòtics.....	Pàgina 159
3.2.2. Anàlisi de la capacitat hemolítica.....	Pàgina 160
3.3. Resultats de l'assaig de resistència a les condicions gastrointestinals.....	Pàgina 162
4. Producció de substàncies antimicrobianes.....	Pàgina 164
4.1. Resultats de l'assaig de difusió en agar.....	Pàgina 164
4.1.1. Resultats de la mesura del pH del sobrenedant.....	Pàgina 164
4.1.2. Resultats de l'assaig de difusió en agar. Taules.....	Pàgina 165
4.1.3. Resultats de l'assaig de difusió en agar. Imatges.....	Pàgina 176
4.1.4. Resultats de l'assaig de difusió en agar. Estadística.....	Pàgina 180
4.2. Resultats de la producció de peròxid d'hidrogen.....	Pàgina 181
5. Capacitat de crioprotecció de la llet d'euga.....	Pàgina 182
5.1. Resultats de l'assaig de conservació de soques BAL equines en llet d'euga.....	Pàgina 182
5.1.1. Resultats de la conservació de <i>Lactobacillus plantarum</i> 3.....	Pàgina 182
5.1.2. Resultats de la conservació de <i>Lactobacillus plantarum</i> 2.....	Pàgina 185
5.1.3. Resultats de la conservació de <i>Lactobacillus brevis</i> 1.....	Pàgina 188
5.1.4. Resultats de la conservació de <i>Lactococcus lactis</i>	Pàgina 191
5.1.5. Resultats estadístics de l'assaig de conservació de soques BAL en llet d'euga.....	Pàgina 193
5.2. Resultats de la conservació de la viabilitat de tres soques de <i>Lactobacillus plantarum</i> durant la liofilització amb llet d'euga comparat amb la llet de vaca.....	Pàgina 194
5.3. Resultats de la conservació de la viabilitat de <i>Lactobacillus plantarum</i> 2 durant 90 dies amb llet d'euga comparat amb la llet de vaca.....	Pàgina 197
DISCUSSIÓ.....	Pàgina 199
1. Caracterització microbiològica de la llet d'euga al llarg de la gestació.....	Pàgina 201
1.1. Discussió sobre els recomptes microbiològics totals de les llets de dues eugues llarg de la gestació.....	Pàgina 201
1.2. Discussió sobre els recomptes microbiològics totals de la llet d'Euga 1 en període no gestant.....	Pàgina 204
1.3. Discussió dels resultats dels aïllaments i caracteritzacions de les colònies	

obtingudes.....	Pàgina 204
2. Caracterització enzimàtica de la llet d'euga al llarg de la gestació.....	Pàgina 206
2.1. Discussió dels resultats corresponents a l'activitat enzimàtica total detectada a la llet d'euga mitjançant API ZYM®.....	Pàgina 206
2.2. Discussió dels resultats corresponents a l'activitat de cadascun dels enzims detectats a la llet d'euga mitjançant API ZYM®.....	Pàgina 207
2.2.1. Esterases i lipases.....	Pàgina 208
2.2.2. Proteases.....	Pàgina 208
2.2.3. Amilases.....	Pàgina 210
2.3. Discussió dels resultats corresponents a la comparació de l'activitat enzimàtica present a les llets de vaca, truja i euga, detectada mitjançant API ZYM®.....	Pàgina 211
3. Avaluació del potencial probiòtic dels BAL de la llet d'euga.....	Pàgina 212
3.1. Discussió dels resultats corresponents a l'avaluació de la seguretat de les soques BAL equines.....	Pàgina 212
3.1.1. Discussió dels resultats corresponents a la sensibilitat als antibiòtics.....	Pàgina 212
3.1.2. Discussió dels resultats corresponents a la capacitat hemolítica.....	Pàgina 213
3.2. Discussió dels resultats corresponents a la resistència a les condicions gastrointestinals per part de les soques BAL equines.....	Pàgina 213
3.3. Discussió dels resultats de l'avaluació final del potencial probiòtic de les soques BAL equines.....	Pàgina 214
4. Discussió dels resultats sobre el potencial probiòtic dels bacteris àcid làctics de la llet d'euga.....	Pàgina 215
4.1. Discussió dels resultats corresponents a l'assaig de difusió en agar.....	Pàgina 215
4.1.1. Discussió dels resultats de la mesura del pH i la temperatura inicials dels sobrenedants assajats.....	Pàgina 215
4.1.2. Discussió dels resultats de les activitats antimicrobianes de les soques BAL detectades mitjançant l'assaig de difusió en agar.....	Pàgina 216
4.1.3. Discussió dels resultats dels valors d'inhibició mostrats per les soques BAL obtinguts mitjançant l'assaig de difusió en agar.....	Pàgina 218
4.2. Discussió dels resultats corresponents a la producció de peròxid d'hidrogen.....	Pàgina 221
5. Capacitat de protecció de soques làctiques de la llet d'euga.....	Pàgina 222
5.1. Discussió dels resultats de l'assaig de conservació en llet d'euga de soques de <i>Lactobacillus</i> spp. i de <i>Lactococcus lactis</i> equines.....	Pàgina 222

5.1.1. Discussió dels resultats de la conservació de la viabilitat de les soques làctiques al procés de liofilització.....	Pàgina 222
5.1.2. Discussió dels resultats de la conservació de la viabilitat de les soques làctiques al llarg de 90 dies d'emmagatzemament.....	Pàgina 223
5.1.2.1. <i>Lactobacillus plantarum</i> 3 (condicions de conservació: 4°C, buit i absència de llum)	Pàgina 223
5.1.2.2. <i>Lactobacillus plantarum</i> 2 (condicions de conservació: T ^a ambient, buit i absència de llum)	Pàgina 223
5.1.2.3. <i>Lactobacillus brevis</i> 1 (condicions de conservació: 4°C, buit i absència de llum)	Pàgina 224
5.1.2.4. <i>Lactococcus lactis</i> (condicions de conservació: 4°C, buit i absència de llum)	Pàgina 224
5.1.3. Concentracions de llet d'euga òptimes per a la conservació de les diferents soques BAL equines.....	Pàgina 225
5.1.4. Discussió dels resultats estadístics referents a la capacitat de crioprotecció de la llet d'euga.....	Pàgina 226
5.1.5. Discussió dels resultats de la conservació de la viabilitat de tres soques de <i>Lactobacillus plantarum</i> equines al ser sotmeses al procés de liofilització protegides amb llet d'euga en comparació amb la llet de vaca.....	Pàgina 227
5.1.6. Discussió dels resultats referents a la conservació de la viabilitat de <i>Lactobacillus plantarum</i> 2 durant 90 dies d'emmagatzemament protegits amb llet d'euga en comparació amb la llet de vaca.....	Pàgina 227
CONCLUSIONS.....	Pàgina 228
BIBLIOGRAFIA.....	Pàgina 229

RESUM

La llet d'euga és un aliment tradicional a l'Àsia central, Mongòlia i l'antiga Unió Soviètica, on ha estat una important font d'alimentació per a les seves poblacions. A Europa el consum de llet d'euga és relativament recent i es troba en expansió. Aquest fet es deu a l'alta qualitat que posseeix. El seu contingut en carbohidrats, proteïnes i sals és més similar al de la llet humana que el de la vaca. El perfil de caseïnes té més semblança a l'humà, fet que la fa més digestible pels infants.

Els objectius d'aquesta Tesi doctoral són la caracterització microbiològica i enzimàtica de la llet d'euga, l'avaluació del potencial probiòtic i de la capacitat antimicrobiana dels bacteris àcid làctics aïllats, i l'avaluació d'aquesta llet com a protector per a processos de liofilització i conservació a llarg termini de soques làctiques.

Els resultats obtinguts dels recomptes microbians de l'anàlisi de les llets crues procedents de dues eugues mostren que aquesta és, des del punt de vista microbiològic, apta per al consum humà. Es confirma que la llet d'euga posseeix un microbioma ampli que es veu modificat, quantitativament i qualitativa, al llarg de la gestació. També s'ha pogut veure com conté una gran varietat d'enzims constitutius detectables mitjançant *kits* comercials miniaturitzats. Aquests enzims presenten una variabilitat quantitativa al llarg de la gestació.

De les 11 soques de bacteris àcid làctics aïllats de la llet d'euga, les que van presentar un potencial ús com a probiòtics per la seva seguretat i resistència *in vitro* a condicions gastrointestinals van ser les anomenades com a *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 2, *Lactobacillus plantarum* 3, *Lactobacillus plantarum* 5 i *Lactococcus brevis* 2. Els bacteris àcid làctics aïllats a la llet i femtes equines posseeixen una capacitat antimicrobiana enfront una gran diversitat de microorganismes indesitjables com *Kocuria rhizophila*, *Pantoea* sp., *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris* i *Enterococcus faecalis*. La seva acció antimicrobiana es deu principalment a la formació d'àcids orgànics, però també a la producció de peròxid d'hidrogen i compostos termolàbils.

La llet d'euga en pols es presenta com una bona alternativa a l'ús de la llet de vaca per a la liofilització de soques de *Lactobacillus* spp. i de *Lactococcus lactis* de procedència equina. A causa de la seva composició, molt similar a la llet materna humana, pot esdevenir un bon excipient per a aliments funcionals o complements alimentaris, especialment aquells destinats a la nutrició infantil i per a persones amb intolerància a la proteïna de la llet de vaca.

ABSTRACT

Mare's milk is a traditional food in Central Asia, Mongolia and the older Soviet Union, where it has been an important source of food for their populations. In Europe mare milk consumption is relatively recent and in expansion, due to the high quality it has. Its content in carbohydrates, proteins and salts is more similar to human milk than cow. The casein's profile is more similar to human, which makes it more digestible for children.

The objectives of this Thesis are the mare's milk microbiological and enzymatic characterization, the evaluation of potential probiotic and antimicrobial capacity of lactic acid bacteria isolated, and the assessment of this milk as a protector for freeze drying processes and long-term preservation of lactic strains.

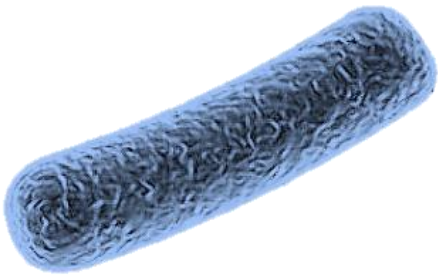
The results of the microbial count analysis of raw milk from two mares show that this is, from the microbiological perspective, suitable for human consumption. It is confirmed that the mare's milk has a broad microbiome that is modified, quantitatively and qualitatively, throughout pregnancy. It has also been seen as containing a variety of constitutive enzymes detectable by commercial kits miniaturized. These enzymes have a quantitative variability during pregnancy.

Of the 11 strains of lactic acid bacteria isolated from mare's milk, six showed a potential use as probiotics because of their safety and in vitro gastrointestinal conditions resistance. The strains were known as *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 2, *Lactobacillus plantarum* 3, *Lactobacillus plantarum* 5 and *Lactococcus*

brevis 2. The lactic acid bacteria isolated from equine milk and feces have an antimicrobial ability against a variety of undesirable microorganisms as *Kocuria rhizophila*, *Pantoea* sp., *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* and *Proteus vulgaris*. Its antimicrobial action is mainly due to the formation of organic acids, but also the production of hydrogen peroxide and thermolabile compounds.

The mare's milk powder is presented as a good alternative to the use of cow's milk for the freeze drying of *Lactobacillus* spp. and *Lactococcus lactis* equine strains. Due to its composition, very similar to human milk, it can be a good excipient for dietary supplements and functional foods, especially those intended for children nutrition and for people with cow's milk protein intolerance.

INTRODUCCIÓ



1. Generalitats sobre la llet d'euga

1.1. Definició

La llet d'euga es pot definir com aquell fluid secretat per la glàndula mamària de les femelles de l'espècie *Equus ferus caballus*, un mamífer d'abastament perissodàctil àmpliament distribuït arreu del món. La seva funció primària és satisfer completament els requeriments nutricionals del poltre durant la primera etapa del seu creixement, des del seu naixement fins als sis mesos de vida aproximadament (Alais, 1985).

Des del punt de vista físico-químic, és una solució aquosa que conté un gran nombre de substàncies: lactosa, glicèrids, proteïnes, sals orgàniques i inorgàniques, vitamines, enzims i nombrosos components a nivell de traces. Aquestes substàncies es poden trobar en tres estats principals: en emulsió, formant grans glòbuls (0,1 -10 µm) hi ha el greix i substàncies associades; en suspensió, formant agregats col·loïdals (20-300 nm) trobem les caseïnes lligades a sals minerals; per últim, en dissolució verdadera, hi ha lactosa, vitamines hidrosolubles, proteïnes del sèrum, sals, etc. (Walstra, 2013).

1.2. Producció i consum

Les vaques produeixen el 83% de la producció mundial de llet, seguit de les búfales amb un 13%, les cabres amb 2%, i les ovelles amb l'1%; les camelles proporcionen un 0,3%. El percentatge restant és produït per altres espècies com ara equins, iacs, rens i rucs. Això suposa el 0,7%, és a dir, una producció força marginal (Figura 1) (FAO, 2014).

El cavall s'ha utilitzat tradicionalment per a la producció de llet a Àsia central, Mongòlia i l'antiga Unió Soviètica, on la llet d'euga ha estat una important font d'alimentació per a les poblacions d'aquestes regions. Actualment es calcula que aproximadament 30 milions de persones arreu del món beuen llet d'euga (Park *et al.*, 2006). Els ramats més importants es troben a Rússia, Mongòlia, el nord de la Xina i la seva perifèria, Kazakhstan, Kirgizstan, Tajikistan, Uzbekistan, i l'est i centre d'Europa (Medhammar *et al.*, 2012).

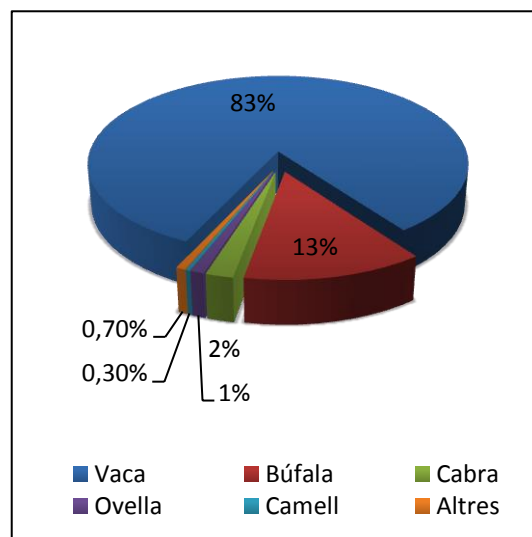


Figura 1. Producció mundial de llet (FAO, 2014).

A Europa el consum humà de llet d'euga és relativament recent. Durant la Primera Guerra Mundial el subministrament de llet d'euga i de burra es portava a terme porta a porta a les cases de països com Alemanya i Bèlgica. Fins fa vint anys la llet es comercialitzava només en petites explotacions alemanyes aïllades. Actualment podem trobar produccions a diferents escales a França (Chevalait, Lait de Jument de Camergue), Àustria (Tochterlehof) i Holanda (de Lage Wierde), a més d'Alemanya (Zollmann) i Bèlgica (Het Brabanderhof). La indústria de la llet d'euga s'està expandint als Països Baixos i Flandes (van der Burg *et al.*, 2011). La comercialització de la llet d'euga a l'Estat espanyol és molt recent. Alguns exemples d'empreses al nostre país són EcoLactis (Madrid) i eQuillet (Catalunya).

Cal destacar la importància de França i Alemanya, de les quals podem trobar a la literatura molt diversos estudis (Malacarne *et al.*, 2002; Drogoul *et al.*, 1992; Zollmann, 1985). Aquests es concentren especialment en el component proteic, el qual és de molt interès en l'ús de la llet d'euga com a substitut de la llet de vaca en nens amb intolerància o al·lèrgia a la llet de vaca (Curadi *et al.*, 2001).

Tot i aquest increment de consum, cal mencionar que la llet d'euga és més cara de produir que la llet de vaca. El major problema que presenta l'espècie és la baixa capacitat de la cisterna del braguer, de només dos litres, el que requereix una elevada

frequència de munyida –generalment de cinc vegades al dia o en intervals de dues hores–, amb el poltre sempre pròxim a l'euga (Solaroli *et al.*, 1993) (Imatge 1).



Imatge 1. Oseledko, V. (2012). Una camperola muny una euga en una zona rural de Suu-Samyr, al Kirguizistan, a l'antiga Ruta de la Seda. Recuperat de: <http://www.gettyimages.co.uk/detail/news-photo/kyrgyz-woman-milks-a-mare-on-the-suu-samyr-plateau-500-news-photo/149701135>

Arreu del món podem trobar molt diverses races de cavalls que s'utilitzen per a la producció de llet: races de Zakakh a l'antiga Unió Soviètica i Mongòlia, races de cavall de Kushum a Kazakhstan, cavalls Lokai a Tadjikistan i Novo-Kirghiz a Kirghzia (Park i Haenlein, 2008). A Mongòlia s'usen moltes races creuades. A Europa la raça més important és la Haflinger. Actualment, però, qualsevol raça es pot desenvolupar per a la producció de llet sempre i quant les eugues acceptin la munyida (Park *et al.*, 2006).

1.3. Formats de presentació i derivats

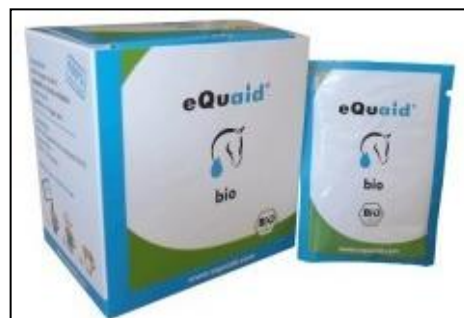
En quant a formats de presentació, en el mercat podem trobar la llet crua o tractada, transformada en producte lacti o bé formant part d'altres productes elaborats que poden ser de consum alimentari o no alimentari.

La llet crua d'euga és molt susceptible al creixement de microorganismes, fet pel qual es deteriora amb molta facilitat (Hogan *et al.*, 1989; Sanaa *et al.*, 1993). És per això que s'ha desenvolupat una gamma de productes més estables que inclouen la llet líquida

pasteuritzada i esterilitzada, llet fermentada, begudes amb base de llet, llet en pols, llet concentrada, mantega i formatge (Imatges 2 i 3).



Imatge 2. Producte comercialitzat de llet fresca d'euga eQuillet®. Recuperat de: <http://www.equaid.com>



Imatge 3. Producte comercialitzat de llet en pols d'euga eQuillet®. Recuperat de: <http://www.equaid.com>

Els països de l'Europa occidental, especialment Alemanya, França i Itàlia, han començat a vendre recentment llet en pols. Els productes es poden consumir directament o rehidratats amb aigua, i mantenen algunes de les propietats característiques de la llet crua com un alt nivell de proteïnes del sèrum i d'àcids grassos poliinsaturats, amb un baix contingut de caseïnes (Marconi i Panfili, 1998).

També és comú a la part més occidental d'Europa la comercialització de la llet d'euga congelada i en càpsules liofilitzades per a les persones que busquen aliments orgànics més especialitzats. Cent grams de llet en pols equivalen aproximadament a 1 litre de llet fresca. Ni la llet congelada ni la liofilitzada porten cap tipus de substàncies preservatives. Tot i que majoritàriament són per al consum humà, una porció d'aquests tipus de llets serveixen per la nutrició de poltres orfes, per aquells que no poden succionar el calostre de la mare o pels que reben un calostre deficitari qualitativament o qualitativa (Park i Haenlein, 2008).

Per tradició i per la seva rellevància cal destacar la importància del kumis (*koumiss*), una beguda tradicional dels ramaders normands, molt popular a Mongòlia, Kazakhstan, Kirguizistan i algunes regions de Rússia. És el resultat de la fermentació àcid-làctica i alcohòlica de la llet d'euga, la qual depèn de l'acció simbiòtica de dos tipus de microorganismes: lactobacils i llevats. Els primers juguen un paper principal i són els

responsables de l'aroma, la textura i l'acidesa del producte. També han demostrat tenir efectes probiòtics (Wu *et al.*, 2009). Degut a aquesta fermentació, el kumis és una beguda que conté un 0.6-3% d'alcohol, és lleugerament gasosa i conté lactat i etanol. Actualment es produeix a nivell industrial (Tamime *et al.*, 1999).

A Europa també és comú usar la llet d'euga per a la cosmètica, amb cremes, sabons i cremes hidratants (Imatge 4). A Noruega s'utilitza com a component del xampú de Gyda, per a pells i cuirs cabelluts

sensibles. A Alemanya trobem la loció de Kumylac, un liofilitzat de llet fermentada usada com a crema hidratant (Park i Haenlein, 2008).



Imatge 4. Sabó amb llet d'euga eQuillet®. Recuperat de: <http://www.equaid.com>

2. Composició de la llet d'euga

2.1. Característiques generals

La composició de la llet és, en termes generals, un tema complex. Les llets dels mamífers presenten diferències substancials entre espècies, ja que la seva composició depèn en primera instància dels requeriments nutricionals del nounat. Factors com la maduresa en néixer, la taxa de creixement i les necessitats energètiques de cada espècie són els principals causants d'aquestes variacions (Fox i McSweeney, 1998).

En quant a la composició intra-espècie, diversos estudis mostren diferents conclusions. Alguns autors mostren una absència de diferències significatives entre les races d'eugues en el contingut de matèria seca, de proteïnes totals (Csapó-Kiss *et al.*, 1995), de greix total o en el perfil d'àcids grassos (Johnston *et al.*, 1970; Csapó *et al.*, 1995). Per a aquests autors la raça tampoc sembla tenir influència en la distribució de les diferents fraccions proteiques ni en la composició dels amino-àcids, ni del valor biològic de la llet, concentracions de cendres, macroelements i microelements. Aquestes afirmacions també es presenten per als calostres de les diferents races (Csapó-Kiss *et al.*, 1995).

Altres autors afirmen que les diferències entre races sí son significatives. Uniacke-Lowe *et al.* (2010) van descriure una sèrie de factors tant genètics com ambientals que afecten la composició bruta de la llet d'euga, incloent la raça, la individualitat dels animals, l'etapa de la lactància, la freqüència i la integritat de la munyida, l'edat materna, la salut i el tipus d'alimentació.

2.2. Comparativa amb altres espècies

Si comparem la llet d'euga amb la llet d'altres espècies d'abast com la vaca, la ovella i la cabra, podem apreciar com la primera conté quantitats substancialment més baixes de sòlids totals, cendra, greix i proteïna totals; el contingut de lactosa i aigua, en canvi, són més elevats (Figures 2, 3 i 4). Aquestes característiques, d'altra banda, la fan més propera a la llet humana; la seva composició d'àcids grassos també és més similar (Uniacke-Lowe *et al.*, 2010; Medhammar *et al.*, 2012).

Alguns estudis han pogut observar com, en general, les llets d'alguns primats i dels perissodàctils (cavalls i rinoceronts) tenen menys matèria seca i menys greix. També s'ha vist, en el cas dels perissodàctils, la síntesi de grans proporcions d'àcids grassos de cadena mitja, el contingut dels quals varia al llarg de la lactació (Osthoff, 2011).

Dins del gènere *Equus*, trobem que la llet d'euga i d'ase (*Equus asinus*) són molt similars entre si: no hi ha diferències significatives en el contingut de proteïna, greix, lactosa, cendres o d'aigua (Medhammar *et al.*, 2012).

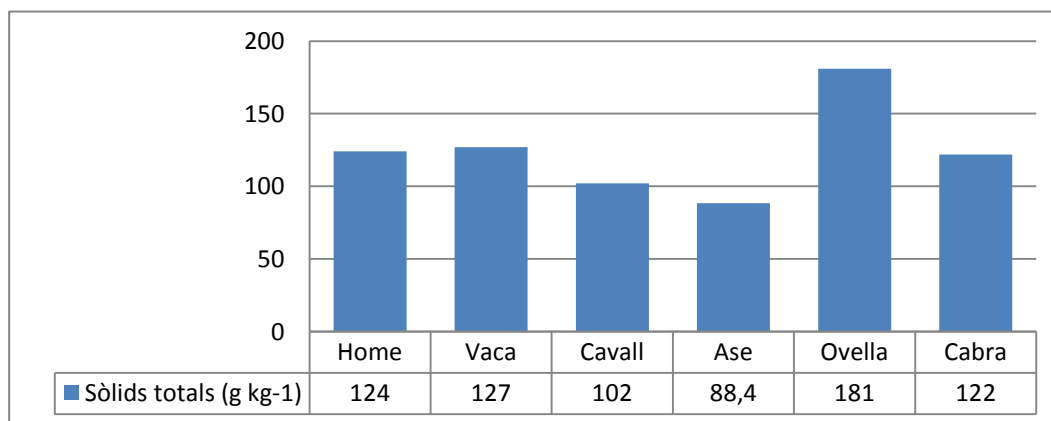


Figura 2. Comparativa entre les quantitats de sòlids totals de les llets de diverses espècies. Els valors de l'eix vertical s'expressen en grams per quilogram de llet. Dades extretes de Uniacke-Lowe *et al.*, 2010.

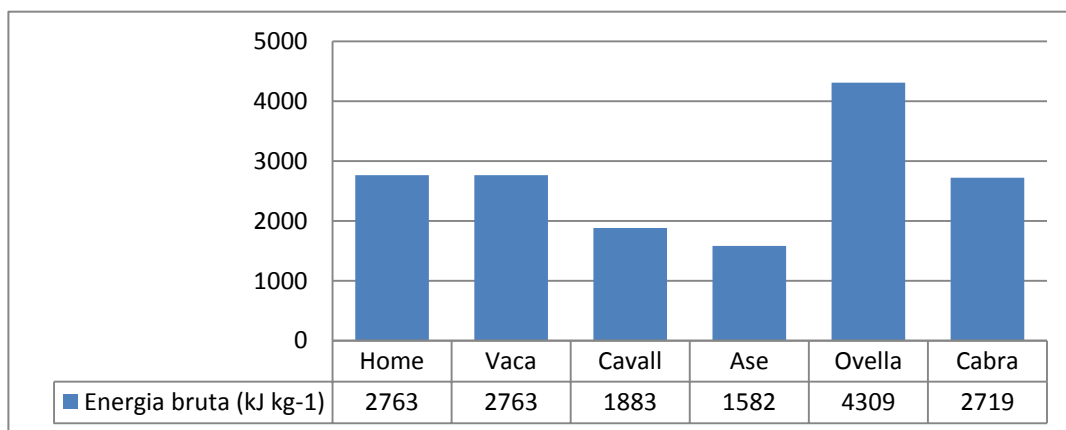


Figura 3. Comparativa de l'energia bruta present a les llets de diverses espècies. Els valors de l'eix vertical s'expressen en kilojoule per quilogram de llet. Dades extretes de Uniake-Lowe *et al.*, 2010.

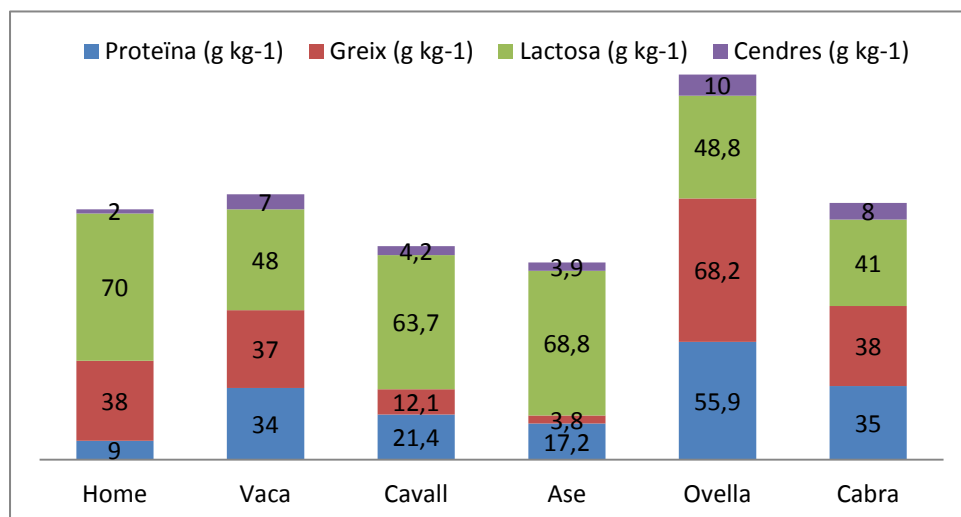


Figura 4. Comparativa entre les quantitats de proteïna, greix, lactosa i cendres de les llets de diverses espècies. Els valors de l'eix vertical s'expressen en grams per quilogram de llet. Dades extretes de Uniake-Lowe *et al.*, 2010.

2.3. Composició dels diferents principis immediats

2.3.1. Composició lipídica

2.3.1.1. El glòbul gras

Els lípids en la llet es troben en forma de glòbuls emulsionats que varien de mida i de composició segons l'espècie. En la llet d'euga mesuren uns 2-3 μm (Welsch *et al.*, 1988). Els seus glòbuls de greix contenen tres capes: una de proteïna interna, una intermèdia de fosfolípids i l'externa de glicoproteïnes d'alt pes molecular que contenen oligosacàrids ramificats, similars a la dels glòbuls de greix de la llet humana i que no es troben a la llet de vaca (Solaroli *et al.*, 1993; Malacarne *et al.*, 2002).

2.3.1.2. Els triglicèrids i els àcids grassos

La llet d'euga és menys rica en triglicèrids que la llet humana i la de vaca. El nombre d'àtoms de carboni en els triglicèrids varia entre les espècies. Si analitzem la llet mitjançant HPLC, podem observar com la distribució del greix de la llet d'euga i de la llet humana segueix un patró unimodal típic (presenta un màxim en 50-52 àtoms de carboni), mentre que a la llet de vaca se segueix un patró bimodal (presenta un primer màxim entre 34-40 àtoms de carboni, i el segon entre 42-54). Des del punt de vista nutricional, l'estructura dels triglicèrids és un factor principal que influeix en l'acció dels enzims lipolítics i, per tant, en l'absorció del greix (Malacarne *et al.*, 2002).

En comparació amb la llet de vaca, el greix de la llet d'euga presenta un alt contingut d'àcids grassos poliinsaturats (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA) i un baix contingut en àcids grassos saturats (*saturated fatty acids*, SFA), particularment marcat en aquesta espècie (Medhammar *et al.*, 2012). Tot i que la llet d'euga té un contingut molt baix de greix total, conté una gran quantitat d'àcids grassos n-3 a causa de l'alt contingut d'àcid α -linolènic (ALA, 18:3). Els alts continguts d'ALA i àcid linoleic (LA, 18:2) i més baixos en àcid esteàric (C18:0) i palmitoleic (C16:1) són naturals en els animals monogàstrics: la hidrogenació microbiana dels àcids grassos en el tracte

digestiu no es produeix abans de l'absorció intestinal en equins, com sí que succeeix en el tracte dels remugants. A més a més, els cavalls consumeixen una gran quantitat de farratge, que és ric en àcids grassos insaturats (Csapó *et al.*, 1995). L'àcid α -linolènic i àcid linoleic són essencials, ja que no poden ser sintetitzats pels éssers humans (FAO, 2010).

Altres àcids grassos presents a la llet d'euga, de major a menor quantitat, són l'àcid palmític (C16:0), oleic (C18:1), dodecanoic (C12:0), mirístic (C14:0), decanoic (C10:0), palmític (C16:0), esteàric (C18:0) i octanoic (8:0) (Csapó *et al.*, 1995).

De tots ells cal mencionar l'àcid palmític, el qual s'associa preferentment a la posició sn-2 (Figura 5). Des del punt de vista nutricional, l'estructura del triglicèrid és un factor primari afectant en l'acció de la lipasa i l'absorció dels greixos. En la llet humana, el palmític es localitza preferentment en la mateixa posició, així que l'assimilació d'aquest àcid gras en els nadons es veu afavorida (Park i Haenlein, 2008).

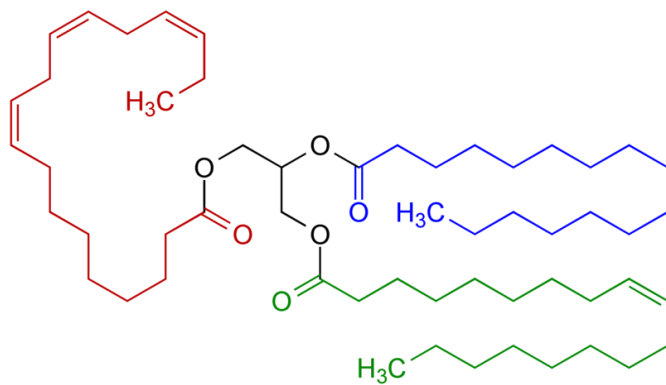


Figura 5. Triacilglicèrid format per glicerol (centre), àcid α -linolènic (vermell) àcid palmític en posició sn-2 (blau) i àcid oleic (verd). De: Wikimedia Commons

2.3.2. Els fosfolípids i els esterols

Els fosfolípids són compostos complexos presents en la membrana cel·lular i constituïts principalment per àcids grassos poliinsaturats. La llet d'euga és més rica en fosfolípids en comparació amb la llet humana o la de vaca. La composició de fosfolípids és també diferent (Jensen *et al.*, 1990). En comparació amb la llet humana, la llet d'euga és més rica en fosfatidiletanolamina i en fosfatidilserina, i menys rica en fosfatidilcolina i fosfatidilinositol; la proporció d'esfingomielina és similar (Malacarne *et al.*, 2002).

En quant als esterols, la llet d'euga sembla tenir una major proporció de la fracció insaponificable en comparació amb les llets de vaca i humana. La fracció d'esterols en la llet d'euga, la llet humana i la de vaca està constituïda parcialment pel colesterol (Jensen *et al.*, 1990; Malacarne *et al.*, 2002).

2.3.3. Composició proteica

El sistema proteic de la llet d'euga és bastant semblant a la de la llet humana. En quant a les principals fraccions de nitrogen trobem que la llet d'egua és similar a la humana, mentre que la llet de remugants té major contingut de caseïna. La riquesa i el patró de la proteïna del sèrum lacti d'egua fa que sigui més favorable que la de vaca i d'ovella per a la nutrició humana ja que aporta un major subministrament d'aminoàcids essencials (Hambraeus, 1994).

Mentre que la caseïna de la llet d'euga es compon de parts gairebé iguals de α_S -caseïna i β -caseïna, la humana i la llet de cabra es caracteritza per una prevalença de β -caseïna, i la llet d'ovella vaca i es caracteritza per un predomini de α_S -caseïna. La llet de la vaca és relativament més rica en α_{S1} -caseïna, que es creu que és responsable de l'aparició de formes al·lèrgiques en lactants. Pel que fa a les característiques estructurals, la llet humana i la d'egua formen un precipitat més fi i suau, i més fàcil de digerir que la llet dels remugants (Potočnik *et al.*, 2011).

Per altra banda, la β -immunoglobulina (β Ig) és la proteïna del sèrum que es troba en major proporció en la llet d'euga, i representa de mitjana el 30.75% del total de les

proteïnes del sèrum. Aquesta proteïna, que també es troba present en la llet de vaca, és absent en la llet humana, i constitueix un dels majors al·lèrgens de la llet (El-Agamy, 2007).

2.3.4. Els hidrats de carboni

Si avaluem la composició en sucres de la llet d'euga, veiem que el més important i majoritari és la lactosa. Comparada amb la resta de llets, la dels èquids és la que presenta un contingut mitjà més elevat de lactosa (principalment la d'euga i la d'ase), seguida de la de la llama. En general, hi ha una relació inversa entre el contingut de cendres i contingut de lactosa a la llet: les que presenten un contingut de cendres més baix (egua i ase) són les que presenten un contingut de lactosa més elevat (Medhammar *et al.*, 2012).

Tot i això, el contingut en sucres i sals de la llet d'euga és similar a la humana. S'ha descrit la presència de galactosa, un monosacàrid present a les membranes cel·lulars, sobretot a la beina mielínica de les neurones. La complexitat estructural de les fraccions menors d'hidrats de carboni de la llet fa que aquest aspecte no hagi estat prou estudiat en la llet d'euga (Malacarne *et al.*, 2002).

2.3.5. Les vitamines

La llet d'euga conté pràcticament les mateixes quantitats de vitamines A, D, i K que la llet de vaca, però el contingut de vitamina C és lleugerament superior. Atès que el contingut de greix de la llet de vaca és 2,5-3,0 vegades més alt que el de la llet d'euga, les concentracions de les vitamines liposolubles (A, D3, E, K3) en el greix de la llet són molt més altes en el greix de la llet d'egua que en la vaca (Csapó *et al.*, 1995). Dues tasses de llet de camell o de dromedari poden subministrar la ingesta de nutrients recomanada (*recommended nutrient intake*, RNI) de vitamina C, mentre que dues tasses de llet d'egua poden subministrar-ne el 72% RNI (Medhammar *et al.*, 2011).

2.3.6. Les cendres

La llet de vaca conté gairebé el doble de la cendra total, potassi, fòsfor, magnesi i manganès, així com un 50% més de calci, ferro i coure i gairebé tres vegades la quantitat de sodi i zinc que la llet d'euga. El baix contingut en sodi de la llet d'euga la fa particularment desitjable com a component de la dieta per als pacients amb problemes cardiovasculars i/o relacionats amb la hipertensió (Csapó-Kiss *et al.*, 1995).

3. Qualitat de la llet d'euga

Degut a la seva composició i característiques, tant la llet com el calostre de l'euga es consideren d'alta qualitat.

3.1. Qualitat del calostre

El calostre conté nivells molt més alts de sòlids totals, proteïna i cendra que la llet madura obtinguda 2 o 3 setmanes després del part en totes les espècies. L'alt nivell de proteïnes en el calostre és degut a l'elevada presència d'immunoglobulines (Igs). Aquests anticossos són essencials per la protecció del poltre enfront a les malalties. La majoria dels poltres neixen amb agammaglobulinemia o hipogammaglobulinemia. És per això que necessiten un calostre amb un alt contingut d'immunoglobulines tan aviat com sigui possible per a dotar-los d'immunitat passiva (Doreau i Boulot, 1989). Es tracta majoritàriament d'immunoglobulina G (IgG). La quantitat d'aquestes es pot mesurar utilitzant un calostròmetre (hidròmetre modificat), el qual mesura la concentració de IgG (Park i Haenlein, 2008).

El període d'encalostament de l'euga és molt més curt que el de les vaques i el calostre mostra diferències significatives amb la llet normal només en el primer dia després de parir (Neseni *et al.*, 1958; Csapó-Kiss *et al.*, 1995). El valor biològic de calostre d'euga munyit immediatament després de parir és dels més elevats dins dels mamífers, degut als seus alts continguts en lisina i treonina. Entre el segon i el cinquè dia aquest valor es redueix a causa de la reducció del contingut en aminoàcids essencials. A mesura que avança la lactació, el valor va decreixent, però es manté elevat en comparació amb la de

la llet de vaca, a causa de la major proporció de proteïna del sèrum i majors quantitats d'aminoàcids essencials, especialment la treonina, en la llet d'euga (Csapó-Kiss *et al.*, 1995).

Finalment, el calostre conté 2.6, 1.7, 1.4 i 1.5 vegades més vitamines A, D3, C i K3 respectivament que la llet d'euga recollida entre els dies 8 i 45 de la lactació. Els continguts de vitamina E del calostre i de la llet són similars (Csapó *et al.*, 1995).

3.2. Llet d'euga com a substitutiu de la llet de vaca en alimentació humana

Alguns estudis com els que es mencionen a continuació afirmen que la llet d'euga és més favorable que la llet de vaca per a l'alimentació humana. El seu contingut en carbohidrats, proteïnes (totals i del sèrum) i sals és més similar al de la llet humana que el de la vaca. El perfil de caseïnes té més semblança a l'humà, fet que la fa més digestible pels infants. La composició d'àcids grassos en la llet euga és similar a la de la llet humana (Pietrzak-Fiećko *et al.*, 2009), sent aquest fet particularment rellevant per a la nutrició humana. La distribució dels glòbuls de greix, així com la dels diglicèrids en la llet d'euga i la humana són similars. La llet dels remugants, més rica en sals, és menys adequada com a substitut de la llet materna. (Malacarne *et al.*, 2002).

La llet d'euga, però, té un contingut més baix d'energia ja que presenta menys greixos, però per altra banda amb un percentatge d'àcids grassos insaturats més elevat. Tenint en compte aquest aspecte, altres estudis també han suggerit que la llet d'euga pot ser utilitzada en la nutrició infantil, ja que els fetges dels nadons són probablement capaços de transformar aquests àcids grassos en àcid eicosapentaenoic (EPA), àcid docosahexaenoic (DHA) i àcid araquidònic (Orlandi *et al.*, 2003).

Els àcids grassos n-3 EPA i DHA, com a part d'una dieta saludable, poden contribuir a la prevenció de la malaltia cardíaca coronària (CHD) i possiblement altres malalties degeneratives associades amb l'envelliment (FAO, 2008). Per a les poblacions com Mongòlia on no hi ha accés al peix (font principal dels n-3), la ingesta de llet d'euga és crucial per a satisfer els requisits nutricionals. Hi ha proves convincents que la

substitució dels SFA (C12:0-C16:0) per PUFA disminueix la concentració de colesterol LDL així com la ràtio lipoproteïna total/d'alta densitat del colesterol (HDL) (FAO, 2010).

En quant a l'ús de la llet d'euga en persones amb al·lèrgies a certs components proteics de la llet, cal recordar que, tot i que la composició de la llet d'euga és més similar a la llet materna, aquesta conté alts nivells de β Ig. Tot i això, certs estudis (Businco *et al.*, 2000) han demostrat que la major part dels infants amb al·lèrgia severa a la llet de vaca mediada per IgE toleren bé la llet d'euga. Cal, per tant, confirmar aquesta tolerància amb un test oral específic.

3.3. Qualitat microbiològica

La qualitat microbiològica de la llet d'euga és superior a la de la llet de vaca, i el seu recompte de cèl·lules somàtiques és inferior (Danków *et al.*, 2006). La mamitis no sembla ser un factor limitant en la producció de llet d'euga. La manca general d'infecció (sugerit per l'absència de colònies als cultius, el recompte de cèl·lules somàtiques baixos, i la manca de reaccions CMT), també suggereixen que potser la ubicació del braguer de l'euga i la mida del mugró tendeixen a limitar l'exposició i per tant l'establiment de patògens (Wells *et al.*, 2012).

3.4. Factors que modifiquen la qualitat de la llet d'euga

La qualitat de la llet d'euga està influenciada per molt diversos factors, molts dels quals encara es desconeixen. Alguns exemples que semblen ser els de major rellevància són la condició corporal, la ingesta de nutrients, el tipus de munyida, les condicions ambientals i la lactació. Entre aquests factors, l'etapa de lactància sembla ser el més important (Csapó *et al.*, 1995). Degut a la importància d'aquest últim factor, les seves causes es tracten àmpliament més endavant (vegeu apartat 3.5).

En quant a la **condició corporal**, cal esmentar que les eugues amb sobrepès produeixen una llet alta en greix, a costa de la proteïna. Diètes altes en greix disminueixen el contingut de proteïna de la llet, al contrari del que succeeix en el cas de la vaca. Aquest fet s'atribueix a un efecte diluent resultat d'un increment en el rendiment lleter. Si a més la dieta és rica en concentrat i pobre en farratge, es produeix una disminució del contingut en greix a causa de la disminució de la síntesi *de novo* de precursors com l'acetat i el butirat. (Doreau i Martuzzi, 2006).

Les eugues amb baix pes, en canvi, es tradueixen en una llet baixa en greix i proteïna. De la mateixa manera, una dieta baixa en proteïna redueix el contingut d'aquesta a la llet. Ambdues alteracions de la condició corporal tenen un impacte en les taxes de creixement dels poltres. (Park *et al.*, 2006).

En el cas de la **ingesta de nutrients**, necessita una sèrie d'adaptacions depenent de diversos factors com l'edat, la raça, la gestació o la lactació. En els últims tres mesos de gestació, el fetus incrementa el seu ritme de desenvolupament, fet que pot provocar un desequilibri nutricional a l'euga si no es modifica correctament la seva dieta.

Cal tenir en compte que la composició d'àcids grassos dels aliments té major influència en la composició d'àcids grassos de la llet en els cavalls que en els remugants. L'acció microbiana en el rumen resulta en una major modificació dels greixos dietètics que la que es produeix en el cavall (Csapó *et al.*, 1995). El contingut en àcid linoleic de la llet de les eugues és major quan aquestes són alimentades en pastures on l'herba és més rica en àcids grassos, així com en aquelles eugues que reben com a suplementació oli de blat de moro ric en àcids oleic i linoleic (Park *et al.*, 2006).

També és important tenir present que l'alt contingut de d'àcids grassos insaturats de cadena llarga en la llet equina es relaciona amb quantitats consumides amb farratge (Chiofalo *et al.*, 2001).

La lactosa de la llet, mostra un comportament estable i independent de la dieta, a causa de la seva contribució en la pressió osmòtica de la llet. Tot i això, alguns estudis manifesten que el contingut de lactosa a la llet és inferior en eugues alimentades amb

fenc que amb concentrat, suggerint un efecte negatiu de les dietes amb farratge en els precursors de la lactosa com la glucosa i el propionat (Park *et al.*, 2006).

En quant al **tipus de munyida**, sembla evidenciar-se que la munyida a màquina de les eugues pot ser més eficient que la duta a terme manualment. Aquest fet, però, podria dependre de l'elecció adequada dels paràmetres tècnics de la màquina de munyir i de la competència tècnica del ramader per la munyida manual d'eugues, les quals són força susceptibles a les pertorbacions (Caroprese *et al.*, 2007).

Pel que fa a les **condicions ambientals**, alguns estudis mostren que el medi ambient pot fer variar el contingut de greix de la llet d'euga. (Malacarne *et al.*, 2002; Neseeni *et al.*, 1958).

3.5. Variacions de la llet d'euga durant la lactació

Els canvis en la llet d'euga deguts a la lactació han estat àmpliament analitzats per diversos autors com Neseeni *et al.*, (1958), Oftedal (1983), Csapó *et al.*, (1995) o Wells *et al.*, (2012). Diverses races han estat objecte d'estudi, com ara la raça primitiva de Konik (Pikul *et al.*, 2008), la Wielkopolska (Pikul i Wójtowski, 2008), la Haflinger (Mariani *et al.*, 2001), la Quarter Horse (Gibbs *et al.*, 1982), la Dutch Warmblood (Bouwman i Van der Schee, 1978) o la Lusitano (Santos i Silvestre, 2008).

Si s'observa el contingut de matèria seca de la llet d'euga, s'aprecia una disminució dràstica del calostre a la llet normal a causa principalment de la disminució en el contingut de proteïnes (Figures 6 i 7); el contingut de proteïna de la llet d'euga disminueix ràpidament fins la segona setmana de la lactància i continua disminuint lentament fins al final del segon mes. La fracció de nitrogen no proteic (*non proteic nitrogen*, NPN) també tendeix a disminuir amb el progrés de la lactància (Bouwman i Van der Schee, 1978; Gibbs *et al.*, 1982).

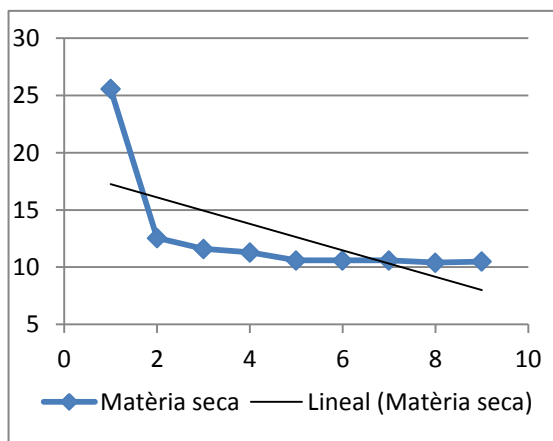


Figura 6. Evolució de la concentració de matèria seca de la llet d'euga al llarg de la lactació. L'eix horitzontal mostra els mesos de lactació, mentre que l'eix vertical mostra el contingut de matèria seca ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$). Dades extretes de Csapó *et al.*, 1995 i Oftedal *et al.*, 1983.

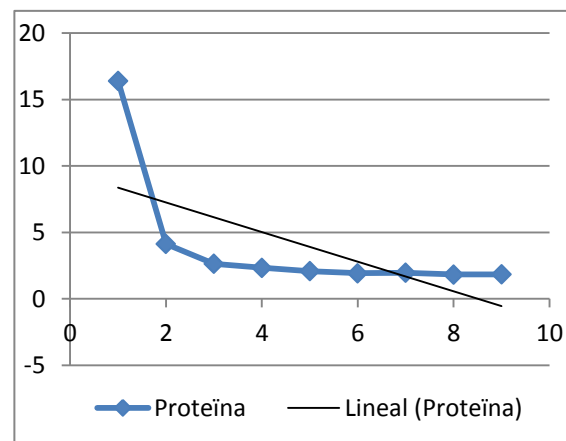


Figura 7. Evolució de la concentració de proteïna de la llet d'euga al llarg de la lactació. L'eix horitzontal mostra els mesos de lactació, mentre que l'eix vertical mostra el contingut de proteïna ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$). Dades extretes de Csapó *et al.*, 1995 i Oftedal *et al.*, 1983.

La composició d'àcids grassos del greix i el contingut de greix de la llet mostren canvis més petits a través del temps (Csapó *et al.*, 1995), disminuint a mesura que avança la lactació de l'euga (Figura 8). El contingut de lactosa augmenta amb l'avanç de la lactància (Figura 9), sent major en eugues munyides a màquina que en les munyides a mà (Martuzzi *et al.*, 2004, Caroprese *et al.*, 2007). Les Figures 10 i 11 mostren l'evolució de la concentració energètica, i de les cendres. Ambdues mostren una tendència a disminuir durant la lactació (Csapó *et al.*, 1995; Oftedal *et al.*, 1983.).

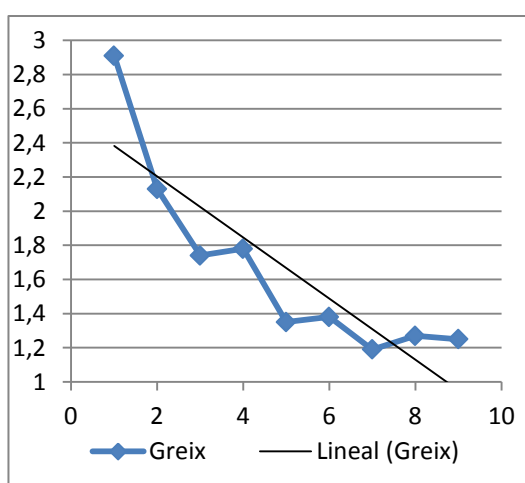


Figura 8. Evolució de la concentració de greix de la llet d'euga al llarg de la lactació. L'eix horitzontal mostra els mesos de lactació, mentre que l'eix vertical mostra el contingut de greix ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$). Dades extretes de Csapó *et al.*, 1995 i Oftedal *et al.*, 1983.

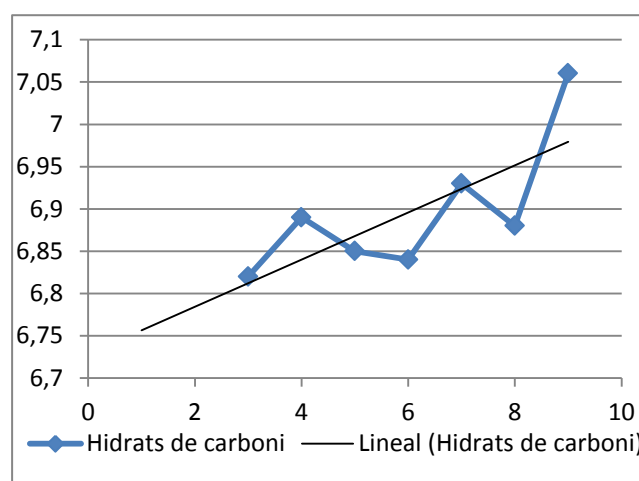


Figura 9. Evolució de la concentració dels hidrats de carboni de la llet d'euga al llarg de la lactació. L'eix horitzontal mostra els mesos de lactació, mentre que l'eix vertical mostra el contingut de hidrats de carboni ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$). Dades extretes de Oftedal *et al.*, 1983.

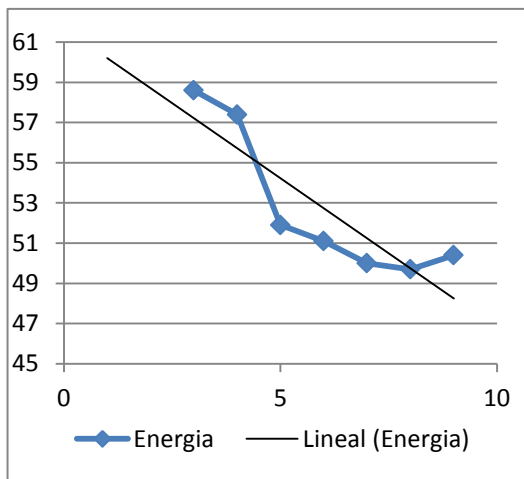


Figura 10. Evolució de la concentració energètica de la llet d'euga al llarg de la lactació. L'eix horitzontal mostra els mesos de lactació, mentre que l'eix vertical mostra el contingut energètic ($\text{kcal}\cdot 100\text{g}^{-1}$). Dades extretes de Oftedal *et al.*, 1983.

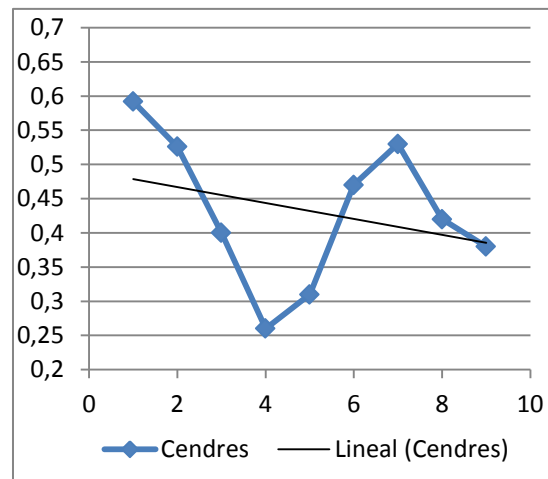


Figura 11. Evolució de la concentració del les cendres de la llet d'euga al llarg de la lactació. L'eix horitzontal mostra els mesos de lactació, mentre que l'eix vertical mostra el contingut de cendres ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$). Dades extretes de Csapó *et al.*, 1995 i Oftedal *et al.*, 1983.

La manca d'una tendència lineal per al recompte de cèl·lules somàtiques general i de nitrogen de l'urea suggereixen que la composició de la llet d'euga ha de ser discutida en etapes més que com un tot (Wells *et al.*, 2012). No hi ha estudis en la literatura disponibles en relació amb els canvis en el nivell de resistència de la llet i el calostre de les eugues en funció del recompte de cèl·lules somàtiques (*somatic cell count*, SCC) i recompte total de bacteris. No obstant això, es pot suposar que, com en el cas de la llet de vaca, l'estat inflamatori de la glàndula mamària d'una euga és la raó principal per a un augment de la SCC en la llet (Auld i Hubble, 1998).

4. Propietats de la llet d'euga

La llet d'euga i els seus derivats tenen propietats beneficioses molt ben conegudes per a la salut humana. Tot i que existeixen nombrosos estudis que ho corroboren (Taula 1), molta informació de la qual es disposa és empírica. A Mongòlia s'utilitza per a tractar l'hepatitis crònica i l'úlceres peptídica. També té propietats antiàcides. Aquests efectes terapèutics poden ser deguts a l'elevat contingut en fosfolípids i en vitamina A.

També es coneix l'ús de la llet d'euga per a tractar la tuberculosi. Es creu que incrementa el nombre d'eritròcits i limfòcits. És un tractament eficaç per a alteracions de la pell com la psoriasi o l'acne. Altres malalties i símptomes inclouen l'anèmia, la nefritis, la diarrea i la gastritis, i altres problemes digestius, especialment per les cures postoperatòries.

Els agents bioactius que se suggereix que confereixen propietats antiinflamatòries a la llet d'euga inclouen el lisozim, les IgA i la lactoferrina (Gustafson *et al.*, 2011).

Sembla que el kumis presenta un millor efecte terapèutic perquè el producte fermentat presenta alguns additius i productes de la fermentació microbiana com pèptids, substàncies bactericides, vitamines sintetitzades i per la presència dels àcids grassos poliinsaturats, el que podria estimular el sistema immunològic i promoure activitats antimicrobianes (Park i Haenlein, 2008).

Propietat	Referència
Modulació de la inflamació crònica	Ellinger <i>et al.</i> , 2002
Tractament combinat de la insuficiència cardíaca refractària	Mirrakhimov <i>et al.</i> , 1986
Acció terapèutica envers la hepatitis crònica	Sharmanov <i>et al.</i> , 1981
Tractament de la úlcera pèptica estomacal i duodenal	Sharmanov <i>et al.</i> , 1980;. Zhangabylov i Salkhanov, 1976
Tuberculosi: augment dels eritròcits i limfòcits, restauració de la velocitat de sedimentació globular normal	Doreau i Martin - Rosset, 2002
Tractament de cremades, lesions de contacte i malalties cutànies	Gobbi, 1993
Tractament de l'acne, la psoriasi i l'èczema atòpic: acció del liozim i la plasmina	Foekel <i>et al.</i> , 2009

Taula 1. Estudis sobre les propietats terapèutiques de la llet d'euga.

5. Microbiologia de la llet d'euga

La llet, per la seva pròpia naturalesa, és un medi de creixement per microorganismes. Està reconegut com a aliment altament perible, fàcilment sotmès a contaminació microbiana (Chambers, 2002).

5.1. Principals fonts de microorganismes a la llet

Hi ha tres fonts principals de microorganismes a la llet: (1) els procedents de dins del braguer, (2) els de l'exterior dels mugrons i del braguer, i (3) els que provenen del maneig i l'equip d'emmagatzematge (Chambers, 2002).

5.1.1. Microorganismes de l'interior del braguer

La llet ha estat tradicionalment considerada estèril; no obstant això, estudis recents en humans han demostrat la presència de microorganismes procedents de l'interior de les mames (Martín *et al.*, 2003). Tradicionalment s'ha cregut que aquests microorganismes eren resultat de la contaminació per bacteris de la pell de la mare o de la cavitat bucal del nounat, que migraven pel canal del mugró durant la succió de la llet.

Estudis més recents, però, suggereixen que alguns bacteris presents en l'intestí de la mare podrien arribar a la glàndula mamària durant l'última etapa de la gestació i la lactància a través d'un mecanisme que implica l'acció dels monòcits intestinals. Per tant,

la modulació de la microbiota intestinal de la mare durant la gestació i la lactància podria tenir un efecte directe sobre la salut neonatal (Fernández *et al.*, 2013).

D'altra banda, la disbiosi mamària pot conduir a la mastitis, inflamació que en la majoria de casos està associada a la implantació de microorganismes patògens. L'ocurrència de mastitis en eugues és baixa si es compara amb altres espècies. Tot i això, estudis com el de Motta *et al.* (2014) han caracteritzat la microbiota de la llet d'euga mastítica. Tot i que tradicionalment, *Staphylococcus aureus* ha estat considerat com el principal agent etiològic de la mastitis aguda i *Staphylococcus epidermidis* la principal causa de la mastitis crònica i subaguda tant en la medicina humana com en la veterinària, els estudis existents sobre mastitis clínica en èquids indiquen que també altres agents com *Arcanobacterium pyrogenes* (Motta *et al.*, 2014), *Streptococcus zooepidemicus* (Welsh, 1984), *Streptococcus* spp., *E. coli* i *Klebsiella* spp (Bostedt *et al.*, 1987), *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp. i *Actinobacillus suis* (McCue i Willson, 1989) poden ser agents etiològics en eugues.

Motta *et al.* (2014), també van caracteritzar la llet d'eugues amb mastitis subclínica, detectant altres microorganismes com *Streptococcus equi*, *Staphylococcus* spp., *Nocardia* sp., *Corynebacterium* sp., *E. coli* o *Candida* sp., entre d'altres.

5.1.2. Microorganismes de l'exterior del braguer

En el cas de les eugues, en la bibliografia existent no trobem cap referència al microbioma exterior del braguer. En vaques i en humana, en canvi, sí que s'han realitzat estudis, dels quals destaca el de Braem *et al.* (2012), on l'exploració de la microbiota de la tetina de vaques lleteres mitjançant tècniques moleculars va revelar una àmplia diversitat d'espècies bacterianes, pertanyents a quatre phyla: Actinobacteria (32% del total de gèneres), Bacteroidetes (1%), Firmicutes (42%), i Proteobacteria (25%), que va abastir un total de 17 gèneres bacterians, dels quals destaquen *Corynebacterium* spp. i *Staphylococcus* spp. L'estudi es va realitzar amb els mugrons prèviament netejats per tal de minimitzar la contaminació d'aquests per microorganismes de l'ambient.

Entre munyides, les mamelles solen embrutar-se amb femtes, fang, palla, serradures, encenalls de fusta o sorra. Si no s'elimina abans de munyir amb una adequada neteja, aquesta brutícia i tots els microorganismes associats es transfereixen a la llet (Chambers, 2002). Aquests microorganismes no serien propis de l'exterior del mugró, i es considerarien contaminació ambiental.

5.1.3. Microorganismes procedents del maneig i l'equip d'emmagatzematge:

La llet es produeix a temperatures ambientals que varien des de condicions sota zero fins a superiors a 25°C. Així mateix, la duració de l'emmagatzemament a la granja pot variar. És per això que la quantitat i la varietat de microorganismes presents quan la llet abandona la granja pot variar i ser impredecible, inclòs sota condicions aparentment similars (Chambers, 2002).

El contingut microbià de l'aire es veu molt afectat per moltes condicions i pràctiques. La part externa del braguer sol estar bruta per fems, fang, palla o altres residus del llet de l'animal. Si bé la flora microbiana de l'interior del braguer és majoritàriament de tipus mesòfil (amb una temperatura òptima de creixement al voltant dels 37°C), a l'exterior se sumen microorganismes psicròfils i termòfils (Magariños, 2000). L'aire es considera generalment que és un factor de menor importància entre les fonts de contaminació, però pot tenir-ne si la munyida es realitza a l'aire lliure en els patis polsegosos sense rentat previ. El manteniment de la zona neta i la minimització de les activitats que creen pols redueixen la contaminació potencial d'aquesta font.

L'ús de les màquines de munyir i tancs bruts, o altres equips similars poden arribar a ser la font més important de contaminació de la llet. La seva incorrecta neteja abans del seu ús proporciona les condicions ideals per al creixement de microorganismes, alguns d'ells capaços de sobreviure a processos com la pasteurització. Les persones involucrades en la munyida i la manipulació de la llet també poden contaminar la llet i per tant han d'estar en bon estat de salut i han de seguir els procediments indicats en les bones tècniques sanitàries. Els equips de munyida han de ser netejats i tractats

eficaçment amb agents bactericides. Compostos d'alta temperatura (aigua calenta o vapor), de clor o d'amoni quaternari s'utilitzen comunament com a agents desinfectants.

Els principals microorganismes contaminants descrits són *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhi*, *Shigella* spp., *Corynebacterium diphtheriae*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp. i *Corynebacterium* spp. (Magariños, 2000)

5.2. Microbiota de la llet d'euga

En general, la microbiota de la llet és molt variable degut a les seves propietats nutritives així com per l'existència de les diverses fonts anteriorment mencionades, les quals contribueixen a aportar microorganismes potencialment colonitzadors al llarg de les diverses etapes de la seva vida útil.

En el cas de la llet d'euga, alguns autors han caracteritzat llets i derivats lactis de diverses procedències mitjançant tècniques de genètica molecular. La Taula 2 mostra els diferents microorganismes que s'han descrit.

Producte	Autor	Procedència	Microorganismes descrits
Llet d'euga	An <i>et al.</i> , 2004	Mongòlia	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> <i>Lactobacillus garvieae</i> <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> <i>Streptococcus parauberis</i> <i>Enterococcus faecium</i>
Llet d'euga	Prestes <i>et al.</i> , 1999	Brasil	<i>Staphylococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Corynebacterium</i> spp. <i>Bacillus</i> spp. <i>Pasteurella</i> spp. <i>Candida</i> spp. <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Shigella</i> spp.

Producte	Autor	Procedència	Microorganismes descrits
Llet d'euga	Pérez, 2014	Espanya	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Leuconostoc mesenteroide</i> <i>Candida krusei</i> <i>Candida sphaerica</i> <i>Candida lusitaniae</i> <i>Candida famata</i> <i>Candida guilliermondii</i>
Llet d'euga mastítica	Motta <i>et al.</i> , 2014	Brasil	<i>Streptococcus</i> spp. <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus equi</i> <i>Nocardia</i> sp. <i>Corynebacterium</i> sp. <i>Staphylococcus hyicus</i> <i>Arcanobacterium pyogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Candida</i> sp.
Chigee (kumis)	An <i>et al.</i> , 2004	Mongòlia	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Lactococcus lactis</i> sb. <i>cremoris</i>
Airag (kumis)	Watanabe <i>et al.</i> , 2008	Mongòlia	<i>Bifidobacterium mongoliense</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus diolivorans</i> <i>Lactobacillus farciminis</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i> <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> <i>Lactobacillus kefiri</i> <i>Lactobacillus parafarranginis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactococcus</i> sp.

Producte	Autor	Procedència	Microorganismes descrits
Kumis	Hao <i>et al.</i> , 2010	Mongòlia	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus jensenii</i> <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> <i>Lactobacillus kitasatonis</i> <i>Lactobacillus kefiri</i> <i>Lactobacillus buchneri</i>

Taula 2. Principals microorganismes descrits en la llet d'euga.

6. Bacteris àcid làctics. Probiòtics.

6.1. Els bacteris àcid làctics

Els bacteris àcid làctics (BAL) són un grup de microorganismes associats per les seves característiques fisiològiques i per les seves rutes metabòliques comunes. Són Gram positius, oxidasa i catalasa negatius, majoritàriament immòbils, no esporulats i en forma de bacil, cocabacil o coc, que tenen per norma general baixes proporcions de contingut G+C en el seu DNA (< 55%) (Carr *et al.*, 2002).

Són àcid tolerants i tenen la capacitat de fermentar els hidrats de carboni. Segons el producte final de la seva fermentació s'agrupen en homofermentadors (produeixen àcid làctic principalment) i heterofermentadors (poden produir altres productes a més de l'àcid làctic, com el diòxid de carboni, l'àcid acètic i l'etanol).

La seva respiració pot variar, anant des de l'aerobiosi fins a l'anaerobiosi, passant per la microaerofília. Els manquen dels citocroms i són incapaçs de sintetitzar porfirines. Requereixen de factors de creixement complexos, com ara vitamines i aminoàcids (König i Fröhlich, 2009).

Els BAL inclouen els gèneres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weisella* -pertanyents a l'ordre *Lactobacillales*, del Fílum Firmicutes- i el gènere *Bifidobacterium*, que pertany a l'ordre *Bifidobacteriales*, del Fílum Actinobacteria. La classificació de les BAL segueix sent el focus dels estudis taxonòmics intensos (Adams, 1999).

Al llarg de la història els bacteris àcid làctics han estat vinculats a la fermentació dels aliments. S'utilitzen en la fabricació de productes lactis com ara la llet àcida, el iogurt o els formatges. També tenen una importància comercial en el processament de carns (salsitxes, pernills curats), begudes alcohòliques (cervesa, licors) i verdures (cogombres, *sauerkraut*). Tot i que els BAL té efectes beneficiosos en la indústria d'aliments, poden ser una molèstia com contaminants mitjançant la producció de males sabors i contribuint al seu deteriorament. Tanmateix, diverses soques de BAL produeixen diverses substàncies antimicrobianes com les bacteriocines, les quals proporcionen un obstacle addicional per al deteriorament i per a la instauració de microorganismes patògens. A més, l'àcid làctic i altres productes fruit del seu metabolisme contribueixen al perfil organolèptic i de textura dels diversos aliments.

La importància industrial dels BAL s'evidencia per ser generalment reconeguts com a segurs (*Generally Regarded as Safe Probiotics*, GRAS), per la seva aparició ubiqua en els aliments i per la seva contribució a la microbiota saludable de les superfícies mucoses humanes. És aquest últim fet de gran importància, i la raó per la qual actualment els BAL també s'utilitzen per al tractament de les disbiosi tant en humans com en animals.

El primer cultiu pur de BAL del que es té constància (*Bacterium lactis*) es va obtenir el 1873 per part de Joseph Lister només deu anys després que Louis Pasteur descrivís la fermentació àcido làctica. La primera monografia és de Sigurd Orla-Jensen (1919).

6.2. Probiòtics

6.2.1. Definició i interès

D'acord amb la definició establerta per l'Organització Mundial de la Salut (OMS), es considera que els probiòtics són aquells “microorganismes vius que quan són administrats en quantitats adequades confereixen un benefici per a la salut de l'hoste”.

Aquest fet va ser observat per primera vegada pel biòleg Élie Metchnikoff el 1908. Des de llavors s'han dut a terme multitud de treballs sobre l'eficàcia dels probiòtics en la millora de la salut humana (treballs com els de Parkes *et al.*, 2009; Collado *et al.*, 2009; Lomax i Calder, 2009; Veerappan *et al.*, 2012), i més recentment en la salut animal (alguns exemples són Vilà, 2009; Kenny, 2011; Pătruică, 2012; Cebrián, 2012).

L'interès per l'ús dels probiòtics en alimentació animal s'ha incrementat notablement arrel de la prohibició de l'ús d'antibiòtics com a promotors del creixement per part de la Unió Europea (Reglament CEE 1831/2003). L'ús massiu d'antibiòtics en animals ha augmentat la pressió selectiva exercida sobre el món microbià, fomentant l'aparició natural de resistències bacterianes al promoure la proliferació de bacteris resistents després de destruir-ne la resta, els quals poden transferir els seus gens de resistència a altres bacteris que mai no han estat exposats als antibiòtics (Verschuere *et al.*, 2000).

Les persistents pressions econòmiques per optimitzar els paràmetres de producció han fet necessària la recerca de noves estratègies de millora, entre les quals destaquen també l'ús de prebiòtics, enzims, àcids orgànics i immunostimulants (Huyghebaert *et al.*, 2011).

6.2.2. Mecanismes d'acció

Els possibles mecanismes d'acció dels probiòtics inclouen (Nagpal *et al.*, 2013):

- Elevada competència amb els bacteris patògens pels nutrients i llocs d'adhesió.
- Producció de substàncies antimicrobianes com ara àcids orgànics, peròxid d'hidrogen i bacteriocines, les quals tenen efectes inhibitoris tant per bacteris Gram positius com per Gram negatius.
- Producció d'àcids grassos de cadena curta per fermentació d'hidrats de carboni, que poden:
 - Reduir el pH del còlon, fet que és perjudicial per als bacteris patògens.
 - Proporcionar nutrients pels colonòcits (cèl·lules del còlon).
- Reducció de la permeabilitat intestinal.
- Modulació de la funció immune de la mucosa gastrointestinal: es creu que components específics de la paret poden incrementar la resposta immune humoral.

6.2.3. Seguretat de les soques probiòtiques

En el procés de selecció de microorganismes probiòtics, cal tenir en compte diversos aspectes com ara la seguretat o les característiques funcionals i tecnològiques. En quant a la seguretat, s'inclouen especificacions com ara l'origen de la soca, la manca de patogenicitat i les característiques de resistència a antibiòtics. En els aspectes funcionals s'inclouen la viabilitat i la persistència en el tracte gastrointestinal, la immunomodulació i les propietats antimutagèniques (Saarela *et al.*, 2000).

Aquests requisits de seguretat i les mesures reglamentàries relatives als probiòtics han de ser proporcionals als riscos previstos. En la majoria dels casos, la manca de patogenicitat de les soques s'ha deduït de l'aparició d'aquella espècie determinada de forma natural en els aliments o com a comensal en l'intestí humà. Els bacteris de l'àcid làctic, juntament amb els bifidobacteris, s'han associat amb infeccions humanes en rares ocasions (principalment bacterièmia i miocarditis en pacients amb una malaltia subjacent greu). Els enterococs, en canvi, poden actuar com patògens oportunistes en entorns hospitalaris provocant endocarditis, bacterièmia, i infeccions intra-abdominals, urinàries i del sistema nerviós central (Wright, 2005).

Un altre aspecte de seguretat molt important és el de resistència als antibiòtics transmissible. L'objectiu de la seva determinació en les soques de microorganismes potencialment probiòtics és evitar que puguin albergar gens de resistència a antibiòtics capaços de transmetre's a patògens humans o animals. A la pràctica, la majoria dels bacteris són resistents a alguns antibiòtics; no obstant això, si la resistència és intrínseca o basada en les peculiaritats fisiològiques o estructurals de la soca (com ara les característiques de la paret cel·lular), és molt poc probable la transferència de la resistència a organismes sensibles. Trobem un clar exemple en el cas de la resistència a la vancomicina inherent en diversos lactobacils, causada per certes peculiaritats estructurals dels peptidoglicans (Wright, 2005).

6.2.4. Taxonomia dels microorganismes probiòtics

Tot i que els BAL són els probiòtics més comuns, altres grups de bacteris i fongs també es consideren probiòtics, com es mostra en la Taula 3.

Microorganismes	Gèneres	Espècies
Bacteris làctics no esporulats	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. cellobiosus</i> .
	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. thermophilus</i> , <i>B. infantus</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> .
	<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. leuconostoc</i> .
	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> .
	<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> .
	<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidolactici</i> .
	<i>Leuconostoc</i>	<i>L. mesenteroides</i> .
Bacteris làctics esporulats	<i>Sporolactobacillus</i>	<i>S. inulinus</i> .
Bacteris no làctics esporulats	<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. clausii</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. cereus</i> .
Bacteris no làctics no esporulats	<i>Propionobacterium</i>	<i>P. freudenreichii</i> .
Llevats	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. boulardii</i> .
Fongs filamentosos	<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> .

Taula 3. Principals microorganismes usats com a probiòtics en humana i en animals (adaptació de Caja *et al.*, 2003).

7. Conservació de soques de bacteris àcid làctics

7.1. El paper dels BAL en l'alimentació: els aliments funcionals

Un aliment funcional és aquell en el qual s'introdueix un o més ingredients nous amb els quals el producte adquireix una nova funció, sovint relacionada amb una millora de la salut o amb la prevenció de malalties (Nagpal *et al.*, 2012). Els aliments funcionals són una de les àrees de creixement més prometedores en la indústria alimentària. Aquests aliments són el resultat de la combinació dels ingredients bàsics de la mescla amb altres ingredients que li aporten un valor afegit. Els nous ingredients es formulen prèviament com a premescla per posteriorment ser introduïts a la mescla base, obtenint com a resultat un producte nutritiu personalitzat (Wright, 2009). La incorporació de BALs en els diversos aliments es considera, doncs, la creació d'un aliment funcional.

La producció de premescles nutricionals eficaces es pot convertir en una tasca difícil. Els dos reptes principals en la formulació i producció d'una premescla són l'homogeneïtat, assegurant que tots els nivells de nutrients específics són els mateixos al llarg de la premescla i l'estabilitat, el manteniment dels nivells durant la vida útil. L'homogeneïtat i l'estabilitat d'una premescla no només afecten la qualitat d'aquesta, sinó també a la dels productes acabats. Quan la incorporació de l'additiu s'ha de dur a terme només en petites quantitats, com és el cas dels probiòtics, és de gran ajuda diluir els ingredients abans d'afegir-los a la barreja prèvia per ajudar a la correcta distribució en la premescla (Wright, 2009).

Per garantir la qualitat d'una premescla cal tenir en compte les característiques de cada nutrient, les seves possibles interaccions i la seva compatibilitat amb altres components. Els additius poden reaccionar amb altres nutrients o components en els productes acabats i poden ser sensibles al pH, la humitat, l'oxigen o la temperatura. Per superar aquests problemes d'estabilitat, és necessària l'estreta vigilància i control del tractament i de les condicions d'emmagatzematge.

L'actual desafiament de la indústria dels additius destinats a l'alimentació és identificar els microorganismes amb propietats probiòtiques, definir-ne el moment idoni per introduir-los en el procés de producció, i formular els organismes de manera que mantinguin la seva viabilitat (Kenny *et al.*, 2011). Els bacteris àcid làctics representen un conjunt important de microorganismes usats com a cultius *starter* i com a probiòtics en la indústria alimentària.

L'aplicació industrial dels BAL depèn de les tecnologies de concentració i conservació que es requereixen per garantir l'estabilitat a llarg termini dels cultius en termes de viabilitat i activitat funcional (Carvalho *et al.*, 2003; Li *et al.* 2010). És essencial, tant tecnològicament com econòmica, maximitzar la viabilitat dels cultius de laboratori durant l'assecat i posterior emmagatzematge durant llargs períodes (Carvalho *et al.*, 2004; Selmer-Olsen *et al.*, 1999).

7.2. La liofilització i l'ús de substàncies protectores

Existeixen diversos mecanismes que ens permeten preservar la viabilitat dels bacteris al llarg del temps, essent els més destacats la crioconservació i la liofilització. La liofilització ha estat la forma clàssica de produir pols seca bacteriana (Heckly, 1984); aquesta pols és més fàcil de manejar que els productes crioconservats. La liofilització és adequada per a la producció de cultius bacterians concentrats, amb l'avantatge que una vegada secs es poden emmagatzemar a temperatura ambient (Palmfeldt, 2003).

En la producció dels aliments funcionals, els BAL són sotmesos a diversos procediments tecnològics estressants. És essencial que la viabilitat dels probiòtics es mantingui perquè romanguin eficaços. Residents naturals de l'intestí, els BAL no

formen espores; una vegada sotmesos a l'assecat, manquen de protecció contra els danys físics o químics que es produeixen durant el procés de granulació. Això fa que el seu ús es vegi restringit només per a certs tipus de formulacions que imposin baixes pressions tècniques sobre els microorganismes, i fa necessari protegir-los específicament contra els impactes mecànics i la calor durant la fabricació, transport i emmagatzematge d'aliments (FEFANA, 2005).

A més a més, la liofilització i posterior emmagatzematge està acompanyat per una disminució de la viabilitat cel·lular degut a que l'assecat exposa les cèl·lules a una etapa de tractament estressant addicional. Les diferents espècies mostren diferents graus de la supervivència de la liofilització (De Valdez *et al.*, 1983). El grau de pèrdua de viabilitat depèn de factors inherents del microorganisme (propietats de deformació, les condicions de creixement i l'estat de creixement) i d'altres factors propis del procés (paràmetres tècnics com ara velocitat de refredament i la temperatura, la presència de crioprotectors, i el tipus de tampons de rehidratació) (Schwab, 2007). Aquests factors poden propiciar el xoc osmòtic i la lesió de la membrana durant la recristal·lització per la formació de cristalls intracel·lulars (Crowe, 1998; Heckly, 1984).

Per tal de minimitzar aquest dany, és habitual l'ús de substàncies protectores. Els sucres estan reconeguts com a tal i s'utilitzen per a la preparació de cultius liofilitzats. Aquests sucres estableixen la membrana cel·lular mitjançant un mecanisme de reemplaçament d'aigua i una sèrie d'interaccions entre els fosfolípids de la membrana i els sucres (Villarreal *et al.*, 2004).

La llet desnatada i la sacarosa s'han usat comunament com a crioprotectors (Hubalek, 2003). La llet desnatada es considera que és capaç de prevenir la lesió cel·lular mitjançant l'estabilització de la membrana cel·lular, proporcionant una capa protectora per a les cèl·lules (Carvalho *et al.*, 2004), mentre que l'activitat protectora de sacarosa es suggereix que es deu a la seva capacitat per evitar la congelació eutèctica perjudicial dels fluids cel·lulars (Hubalek, 2003).

Existeix un ampli ventall de substàncies protectores disponibles, les quals es resumeixen a la Taula 4.

Component	Fórmula
Sulfòxids	
Dimetilsulfòxid	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$
Alcohols monohídrics i derivats	
Metanol	CH_3OH
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
Alcohol polvinil	$[\text{CH}_2\text{CHOH}]_x$
Diols i derivats	
Etilenglicol	$(\text{CH}_2)_2(\text{OH})_2$
Propilenglicol	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})_2$
Trimetilenglicol	$\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{OH})_2$
Dietilenglicol	$\text{O}(\text{CH}_2)_4(\text{OH})_2$
Polietilenglicol	$\text{H}[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_x\text{OH}$
Polipropilenglicol	$\text{H}[\text{OCHCH}_3\text{CH}_2]_x\text{OH}$
Polietilenoxid	$(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-)_x$
Triols	
Glicerol	$(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{OH})_3$
Polialcohols	
Mannitol, sorbitol, dulcitol	$\text{C}_6\text{H}_8(\text{OH})_6$
Monosacàrids	
Glucosa	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
Xilosa	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$
Disacàrids	
Sucrosa	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$
Lactosa, maltosa	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$
Trehalosa	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Trisacàrids	
Rafinosa	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_{16} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Polisacàrids	
Dextrà, manà	$[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]_x$
Dextrina	$(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5) \cdot x\text{H}_2\text{O}$
Hidroxiethyl starch	
Ficoll	
Goma aràbica (acacia)	
Amides, N-alkilamides, imides	
Acetamida	NH_2COCH_3
Metil acetamida	$\text{CH}_3\text{NHCOCH}_3$
Dimetilformamida	$(\text{CH}_3)_2\text{NCOH}$
Dimetil acetamida	$(\text{CH}_3)_2\text{NCOCH}_3$
Succinimida	$\text{NH}(\text{CO})_2(\text{CH}_2)_2$
Compostos heterocíclics	
Metil pirrolidona	$\text{CH}_3\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{CO}$
Polivinilpirrolidona	$[\text{CHN}(\text{CH}_2)_4\text{CO}]_x$
Aminoàcids i àcids carbònics	
Prolina	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCHCOOH}$
Glicina	$\text{CH}_2\text{NH}_2\text{COOH}$
Àcid glutàmic	$(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2\text{CH}(\text{COOH})_2$

Component	Fórmula
Àcid glutàric	$(\text{CH}_2)_3(\text{COOH})_2$
Acetat amoni	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$
EDTA	$(\text{CH}_2)_2\text{N}_2(\text{CH}_2\text{COOH})_4$
Proteïnes, pèptids, polipèptids, i glicoproteïnes	
Sèrum sanguini, albúmines	
Gelatina, peptones	
Extracte de closca	
Glicoproteïnes, mucina	
Valinomicina	$\text{C}_{54}\text{H}_{90}\text{N}_6\text{O}_{18}$
Gramicidina	$\text{C}_{60}\text{H}_{92}\text{N}_{12}\text{O}_{10}$
Substrats complexos	
Extracte de llevat	
Extracte de malta	
Llet en pols	
Mel	
Surfactants no iònics	
Tween 80	
Triton, macrocyclon	

Taula 4. Principals protectors emprats per a la conservació de bacteris. Adaptat de Hubalek, 2003.

8. Activitat enzimàtica de la llet d'euga

8.1. Els components bioactius de la llet d'euga

A més de proveir al poltre de l'energia necessària per al creixement i de tots els principis immediats importants, la llet d'euga té moltes altres funcions específiques, les quals es resumeixen a la Taula 5. Aquestes funcions les duen a terme els anomenats components bioactius, dins els quals trobem estructures proteiques, lipídiques, o pròpies dels carbohidrats, enzims, hormones i factors de creixement, entre d'altres. El rol potencial d'aquests components en suplementes per a la promoció de la salut i per a la prevenció de les malalties és important en el camp de la salut pública (Sheng i Fang, 2009).

Component	Funció
Proteïnes	
α -lactoalbúmina	Síntesi de la lactosa; transportador del calci; activitat lítica cel·lular
β -Lactoglobulina	Activitat fixadora del retinol
Immunoglobulines	Protecció immunològica
Lactoferrina i lactotransferrina	Activitat quelant de ferro
Albúmina del sèrum	Activitat de fixació de lípids
Greixos	
Àcid palmític posició Sn-2	Facilitador de l'assimilació
Àcids linoleic i linolènic	Precursors de ω -3 i ω -6; protecció de la inflamació al·lèrgica
Àcids grassos poliinsaturats de cadena llarga	Efectes vasodilatadors o vasoconstrictors, necessaris per a la funció retinal; precursors d'eicosanoides
Fosfolípids	Part de totes les cèl·lules vives

Component	Funció
Àcid linoleic conjugat	Potencial anticarcinogen
Carbohidrats	
Galactosa	Assegura els nivells de galactosa
Oligosacàrids	Benefici de l'assimilació; inhibició de la infecció bacteriana; estimulació del creixement i/o metabolisme de <i>Bifidobacterium</i> sp.; T-antigen.
Enzims	
Lisozim	Bacteriostàtic i activitat de fixació del calci
Lipasa	Lipòlisi dels greixos
Plasmina	Hidròlisi de la β - caseïna
Deshidrogenasa	Deshidrogenació de l'àcid làctic
Aminotransferasa	Influència en el metabolisme dels carbohidrats; mediació del glutatió; síntesi i descomposició dels aminoàcids.
Hormones i factors del creixement	
Insulina i factor de creixement similar a la insulina-I	Promotor del creixement; afavoriment del desenvolupament normal cel·lular; protecció del sistema nerviós central
Proteïna d'unió de prolactina	Inhibidors o potenciadors de l'acció de la prolactina
Proteïna relacionada amb l'hormona paratiroidal	Modulador del metabolisme ossi; participació en la diferenciació i la proliferació cel·lular
Triiodotironina (T3) i 5'-monodeiodinasa	Donar suport lactogènesi; acció dins del tracte intestinal
Progestagen	Diagnòstic de la gestació precoç i dels cicles d'estre postpart
Leptina	Modulació de la gana i del consum d'energia
Altres	
Factor bífidus	Activació del creixement de <i>Lactobacillus bífidus</i> var. <i>Penn</i>
Carnitina	Activitat de fixació de LCPUFA
Lactadherina/factor de creixement epidèrmic	Activitat antibacteriana; promotor de la mitosi cel·lular epidèrmica, inhibició de la secreció àcida de l'estómac
Amiloide A	Protecció intestinal neonatal
Interleucina -1	Activitat antiinflamatòria
Bacteris àcid-làctics	Probiòtics

Taula 5. Resum dels principals components bioactius de la llet d'euga. Adaptat de Sheng i

Fang, 2009.

8.2. Els enzims de la llet d'euga

Fins a dia d'avui, només han estat estudiats en detall els enzims de la llet de vaca; la informació sobre altres espècies com la cabra, ovella o búfal prové d'estudis esporàdics i limitats. Estendre el rang d'espècies investigades aportaria resultats interessants, considerant les grans diferències interespecífiques en els nivells i les activitats dels enzims que s'han trobat en aquests estudis (Kelly i Fox, 2006).

Considerant l'origen dels enzims de la llet (de les glàndules mamàries i de la sang) és d'esperar que les activitats dels enzims de la llet no siguin constants, i que variïn depenent de l'estat fisiològic i de l'estat de salut de l'animal lactant. Les activitats enzimàtiques poden variar significativament segons la fase de lactació, la dieta, l'estrès, la mastitis, etc.

Tot seguit s'exposen els principals enzims estudiats en la llet d'euga.

8.2.1. Lisozim

El lisozim és un enzim de gran importància a la llet, ja que juga un important paper en la coagulació d'aquesta, a més de ser un potent antibacterià al catalitzar la hidròlisi de les unions β (1-4) entre els residus d'àcid N-acetilmuràmic i N-acetil-D-glucosamina dels peptidoglicans presents en la paret bacteriana. Juga un paper important en la defensa de l'intestí del nadó enfront els patògens.

La llet humana i la d'euga contenen al voltant de 3000 vegades més lisozim que la llet de vaca, per raons encara desconegudes. En el cas dels èquids, aquest enzim presenta estructures secundàries i terciàries molt similars als de la lactoalbúmina bovina, i comparteix la funció de lligar el Ca^{2+} . Tot i això, el lisozim de la llet d'euga mostra diverses peculiaritats: presenta una certa quantitat de lisozim en forma N-glicosilada, només té un 51% d'homologia de seqüència amb el lisozim de la llet humana i un 50% amb la d'ou de gallina domèstica, i és termostable *in vitro*. Després d'un tractament

tèrmic a 82°C durant 15 minuts presenta un 68% d'activitat residual, mentre que la llet materna només conserva el 13%.

8.2.2. Lipases

La llet d'euga té lipases en quantitats molt petites (Neseni *et al.*, 1958). És termolàbil i sensible a NaCl. Té característiques de lipoproteïna lipasa (LPL) i es creu que prové de la mateixa glàndula mamària, on hidrolitzen els triglicèrids procedents de la sang, donant a lloc a la major part dels àcids grassos de cadena llarga i poliinsaturats de la llet. Aquesta lipòlisi contribueix a modificar el gust de la llet durant el seu emmagatzematge i processament (Sheng i Fang, 2009). Pot jugar un paper positiu en la maduració del formatge, però l'aspecte més important és el seu paper en la ranciessa hidrolítica que atorguen a la llet i els productes lactis líquids un sabor desagradable (Fox, 2003b).

8.2.3. Esterases

L'esterasa de la llet no està present en la llet bovina ni caprina però sí en la llet humana i d'egua. La llet conté diversos tipus de esterases segons el tipus d'èsters que hidrolitzen (aromàtics, alifàtics, èsters de colina). A la llet normal, les esterases que presenten major activitat són les de tipus B, on s'inclou l'esterasa lipasa. Canvis en les proporcions dels diversos tipus suggereixen alteracions de les glàndules mamàries. L'esterasa lipasa és capaç d'hidrolitzar enllaços d'èsters emulsionats en la interfície aigua/oli (Fox, 2003b).

8.2.4. Plasmina

La plasmina és una proteïnasa que hidrolitza la β -caseïna i, en menor mesura α -s1 i κ -caseïna de la llet, produint γ -caseïnes. La seva activitat contribueix a la maduració dels formatges, però redueix l'estabilitat durant l'emmagatzematge de la llet UHT (Fox, 2003a) degut a la seva estabilitat tèrmica (Fox i Kelly, 2006). Humbert *et al.*

(2005) van demostrar una gran activitat de la plasmina en la llet fresca euga. La llet d'euga emmagatzemat a temperatura baixa o negativa té més activitat que la plasmina soluble a temperatura ambient. També van informar que els protocols s'apliquen generalment a la llet bovina o plasminògens de sang d'equí no van poder activar el plasminogen de la llet d'euga a plasmina.

8.2.5. Deshidrogenasa

L'àcid làctic deshidrogenasa (LDH) és un enzim que ajuda a produir energia. És present en gairebé tots els teixits en el cos. A la llet euga, l'activitat LDH és més alta el primer dia de lactació, mostra una marcada disminució en el tercer dia, seguida per una lleugera disminució fins al 20 dies, i després es manté a un nivell constant d'aproximadament 80 μ L (Rieland *et al.*, 1998).

8.2.6. Aminotransferases

Les activitats enzimàtiques de γ -glutamilttransferasa (γ -GGT), glutamat-oxalacetat transaminasa (GOT) i glutàmic-pirúvic transaminasa (GPT), es troben presents a la llet de les eugues durant la lactació. Aquests enzims participen en la síntesi i descomposició d'aminoàcids, influencien el metabolisme dels carbohidrats produint efectes favorables en els processos d'adaptació dels nounats, i intervenen en el glutatió afavorint així el subministrament d'àcid ascòrbic a les cèl·lules bronquials (Corti *et al.*, 2008). Les activitats γ -GT i GPT són més altes el tercer i el primer dia, respectivament, i disminueixen durant la lactància. L'activitat GOT és més elevada el primer dia (Rieland *et al.*, 1998).

8.3. Tècniques de mesura dels enzims de la llet

La mesura de l'activitat dels enzims de la llet és un àrea complicada que requereix d'una estandardització de metodologies. Disposem de diverses tècniques per mesurar l'activitat dels diferents enzims presents en la llet (Kelly i Fox, 2006):

- Concentració total dels enzims a la llet, per exemple, mesurat per un assaig d'immunoabsorció lligat a enzims (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA). Cal tenir en compte que la metodologia ELISA no permet distingir entre els enzims actius i inactius.
- Activitat real o efectiva dels enzims de la llet, com la mesurada per tècniques que no eliminen les possibles substàncies inhibidores de l'entorn de l'enzim durant el mesurament de l'activitat, i per tant podria dir-se que mesuren l'activitat de l'enzim efectiva en les mostres.
- Mesura indirecta de l'activitat enzimàtica mitjançant la quantificació dels productes resultants de la seva acció.

9. Activitat antimicrobiana dels bacteris àcid làctics

Els BAL han estat àmpliament estudiats per la seva habilitat per produir components amb propietats antimicrobianes. Aquestes substàncies han despertat un gran interès en els últims anys pel seu potencial ús com a biopreservadors en la indústria alimentaria, aportant una solució més innòcua i ecològica al problema de la conservació de tota mena de productes (Acuña *et al.*, 2011).

La biopreservació consisteix en l'ús de soques controlades de microorganismes i/o els seus compostos antimicrobians amb la finalitat d'allargar la vida útil dels aliments, així com millorar la seva seguretat. Els bacteris àcid làctics (BAL) tenen un major potencial d'ús com a biopreservadors perquè generalment són segurs per al consum i pel fet que dominen naturalment la microbiota en diversos aliments (Stiles, 1996). En conseqüència, certs BALs associats als aliments i amb propietats antimicrobianes demostrades s'estan sotmetent a assaig per augmentar la seva seguretat i perllongar la seva vida útil. Les propietats antimicrobianes de les BAL es deriven de la competència pels nutrients i la producció d'un o més metabòlits, els quals es detallen a continuació.

9.1. Àcids orgànics

L'acció inhibidora més evident duta a terme per aquests bacteris consisteix en l'acidificació del medi mitjançant la conversió fermentativa dels carbohidrats a àcids orgànics (làctic, acètic i propiònic). Aquesta disminució del pH afecta a la homeòstasi

cel·lular de moltes espècies bacterianes, causant la inhibició del creixement o la mort d'aquests. S'ha proposat que el baix pH extern provoca l'acidificació del citoplasma de la cèl·lula, mentre que la forma no dissociada de l'àcid, la qual és lipòfila, pot difondre passivament a través de la membrana. L'àcid no dissociat actua pel col·lapse del gradient de protons electroquímic o mitjançant l'alteració de la permeabilitat de la membrana cel·lular que resulta en la interrupció dels sistemes de transport de substrat (Ammor *et al.*, 2006).

Els àcids orgànics tenen un ampli espectre d'acció, essent capaços d'inhibir tant els bacteris Gram positius com els Gram negatius, així com els llevats i els fongs miceliars. Tejero-Sariena *et al* (2012) van investigar les propietats antimicrobianes de soques procedents dels gèneres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* i *Bacillus* enfront a *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* i *Clostridium difficile* mitjançant un *Agar spot test* el qual va mostrar com la majoria de les soques seleccionades eren capaces de produir components actius enfront els patògens; els sobrenadants dels cultius es van testar mitjançant un assaig de difusió i van produir resultats similars. La seva neutralització amb substàncies alcalines va reduir els efectes antagònics, el que va indicar el rol probable dels àcids orgànics en els efectes antibacterians. Un anàlisi final dels productes va demostrar que els àcids làctic i acètic eren els productes finals principals del metabolisme de les BAL i les responsables d'aquestes inhibicions.

9.2. El peròxid d'hidrogen

El peròxid d'hidrogen (H_2O_2) és produït pels BAL en presència d'oxigen com a resultat de l'acció de flavoprotein oxidases o de la NADH (nicotinamida adenina dinucleòtid) oxidasa. L'efecte antimicrobià de H_2O_2 pot resultar de l'oxidació dels grups sulfhidril que causen la desnaturalització d'un nombre d'enzims, i de la peroxidació dels lípids de la membrana, augmentant així la permeabilitat d'aquesta. El H_2O_2 també pot ser un precursor per a la producció de radicals lliures bactericides com el superòxid (O_2^-) i radicals hidroxil (OH^\cdot) que poden danyar el DNA (Byczkowski i Gessner, 1988; Piard i Desmazeud, 1991; Yang, 2000). El H_2O_2 es produeix en suficients quantitats per alguns lactobacils per inhibir *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Proteus* spp., *Listeria*

monocytogenes, *Staphylococcus aureus* i *Salmonella* Typhimurium (O'Bryan *et al.*, 2014).

9.3. El diòxid de carboni

El diòxid de carboni es produeix principalment pels BAL heterofermentatius. El mecanisme precís de la seva acció antimicrobiana és encara desconegut. No obstant això, el CO₂ pot jugar un paper en la creació d'un ambient anaeròbic que inhibeix descarboxilacions enzimàtiques, i la seva acumulació a la bicapa lipídica de la membrana pot causar una disfunció de la permeabilitat (Yang, 2000; Erginkaya *et al.*, 2014). També és capaç d'inhibir eficaçment el creixement de molts microorganismes causants de deteriorament d'aliments, especialment els bacteris psicòtrops Gram-negatius. El grau d'inhibició pel CO₂ varia considerablement entre els organismes (Ammor *et al.*, 2006).

9.4. El diacetil

El diacetil, és un component orgànic volàtil produït per soques dins de tots els gèneres de LAB per la fermentació del citrat. Inhibeix el creixement dels bacteris Gram-negatius per reacció amb la utilització d'arginina. També inhibeix, amb menor intensitat, altres bacteris com *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *E. coli* i *Aeromonas* spp. Utilitzat sinèrgicament amb altres antimicrobians permet disminuir-ne la dosi efectiva i pot contribuir a ajudar a la preservació dels aliments (Yang, 2000; O'Bryan *et al.*, 2014).

9.5. Les bacteriocines

Molts BAL produeixen una classe de components d'alt pes molecular únics anomenats bacteriocines. Una de les més conegudes és la nisina, la qual s'utilitza per a la preservació dels aliments (Carr *et al.*, 2002). És la millor definida, i l'única bacteriocina purificada produïda per BAL que ha estat aprovada per al seu ús en productes alimentaris (Hansen i Sandine, 1994; Carr *et al.*, 2002).

Les bacteriocines han atret un gran interès en la indústria alimentària per la seva potencial aplicació industrial per a la conservació d'aliments. Es tracta de pèptids bioactius o complexos de pèptids (generalment de 30 a 60 aminoàcids) sintetitzats pel ribosoma i alliberats extracel·lularment que tenen un efecte bactericida o bacteriostàtic en altres espècies, generalment estretament relacionades. La cèl·lula productora de la bacteriocina exhibeix immunitat específica a l'acció d'aquesta (Garneau *et al.*, 2002).

El seu mecanisme d'acció consisteix en la dissipació de la força motriu de protons a través de la formació de porus en la bicapa fosfolipídica de la membrana citoplasmàtica i dissipar la força motriu protònica a través de la formació de porus en la bicapa de fosfolípids (Montville *et al.*, 1995). Aquests compostos antibacterians poden constituir interessants armes per lluitar contra el creixement de *biofilms* o biopel·lícules, així com envers l'adhesió de microorganismes indesitjables en les superfícies de processament (Ammor *et al.*, 2006).

Alguns BAL semblen ser capaços de controlar el creixement d'alguns microorganismes patògens com *Listeria monocytogenes* en productes alimentaris mitjançant la producció de bacteriocines (Mataragas *et al.*, 2003). La Taula 6 mostra algunes de les principals bacteriocines descrites i els microorganismes que les produeixen.

Bacteriocina	Espècies productores	Bacteris inhibits
Nisina	<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Brochothrix thermosphacta</i> , altres Gram positius
Lacticina 3147	<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i>	Gram positius
Lacticina 481	<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i>	Gram positius
Lactococcina B	<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.
Enterocines A i B	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Lactocina 705	<i>L. casei</i>	<i>Listeria</i> spp., BAL, estreptococs
Lactacina B	<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Lactococcus lactis</i>
Lactacina F	<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.
Sakacina P, Lactocina S, Sakadina A	<i>L. sakei</i>	<i>Lactobacillus</i> spp. estretament relacionades, <i>Listeria</i> spp.
Pediocina AcH	<i>P. acidilactici</i> , <i>L. plantarum</i>	<i>Listeria</i> spp., BAL, <i>Staphylococcus aureus</i>
Mesentericina Y105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Listeria</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp.
Mundticina	<i>Enterococcus mundtii</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , BAL
Enterolisina A	<i>Enterococcus faecalis</i> LMG 2333	<i>Enterococcus</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp.
Helveticina J	<i>L. helveticus</i> 481	<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i>
Reuterina	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Fungi, Protista, bacteris Gram positius i Gram negatius
Bavaricina A	<i>L. bavaricus</i>	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i>
Lactacina F	<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Enterococcus faecalis</i>
Curvacina A	<i>L. curvatus</i>	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Carnobacterium</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i>

Taula 6. Principals bacteriocines produïdes per bacteris àcid làctics. Adaptat de O'Bryan *et al.*, 2014 i Erginkaya *et al.*, 2014.

9.6. Altres substàncies antimicrobianes produïdes pels BAL

En les últimes dècades s'han evidenciat altres sistemes antagonics més complexos produïts per aquests cultius. Aquestes substàncies es produeixen en quantitats molt més petites que l'àcid làctic i acètic, i inclouen l'àcid fòrmic, àcids grassos lliures, amoníac, etanol, acetoina, 2,3-butanodiol, l'acetaldehid, benzoat i enzims bacteriolítics, així com diverses substàncies menys conegudes. Algunes d'aquestes substàncies presenten activitat antagonista envers molts microorganismes patògens transmesos pels aliments i causants del seu deteriorament, incloent lactobacils i leuconostocs psicotròpics, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*,

Staphylococcus aureus, etc. Desafortunadament, en alguns casos l'efecte antimicrobià és perjudicial per la inhibició d'altres soques làctiques desitjables en cultius iniciadors mixtos (De Vuyst i Vandamme, 1994).

10. Legislació de la llet d'euga.

Disposicions legals.

Com a producte d'origen animal la llet crua d'euga pot presentar perills per la salut pública, el que requereix l'establiment de normes específiques d'higiene donades per les diverses disposicions legals que la defineixen, estableixen els seus usos, garanteixen la seva innocuïtat i especifiquen els processos d'obtenció i processament d'aquesta.

10.1. Disposicions legals

La reglamentació europea no regula directament la llet d'euga, la qual trobem englobada en el grup "llet d'altres espècies", on s'inclou la llet de tots aquells mamífers d'abastament diferents a la vaca. A continuació es mencionen les diverses disposicions europees i espanyoles per les quals es normalitzen assumptes tant importants com és la correcta extracció i posterior manipulació de la llet, els equips necessaris per la munyida, la valoració de l'estat sanitari de la llet i els derivats lactis, o els organismes autoritzats per al seu anàlisi.

Degut a la rellevància que posseeix la microbiologia de la llet d'euga en aquesta tesi, en l'apartat 10.2 i 10.3. es mencionen amb més detall les especificacions microbiològiques i els tractaments tèrmics aplicats a la llet i als seus derivats per normativa europea.

10.1.1. Disposicions comunitàries de directa aplicació:

- Reglament (CE) 853/2004, del 29 d'Abril del 2004, del Parlament Europeu i del Consell, pel qual s'estableixen normes específiques d'higiene dels aliments d'origen animal.
- Reglament (CE) 854/2004, del 29 de Abril del 2004, del Parlament Europeu i del Consell, pel qual s'estableixen normes específiques per l'organització de controls oficials dels productes d'origen animal destinats al consum humà.
- Reglament (CEE) 1898/87, del 2 de Juliol de 1987, relatiu a la protecció de la denominació de la llet i dels productes lactis en el moment de la seva comercialització.

10.1.2. Disposicions nacionals:

- Reial Decret 1338/2011, del 3 d' octubre, pel qual s'estableixen diferents mesures singulars d'aplicació de les disposicions comunitàries en matèria d'higiene de la producció i comercialització dels productes alimentaris.
- Ordre PRE/406/2006, del 14 de febrer, per la qual es deroguen l'Ordre del 3 d'octubre de 1983, per la qual s'aprova la norma general de qualitat per a la llet pasteuritzada, l'Ordre del 3 d'octubre del 1983, per la qual s'aprova la norma general de qualitat per a la llet esterilitzada i l'Ordre del 7 d'octubre del 1983, per la qual s'aprova la norma general de qualitat per a la llet UHT (B.O.E. 21.02.2006).
- Reial Decret 640/2006, del 26 de maig, pel qual es regulen determinades condicions d'aplicació de les disposicions comunitàries en matèria d'higiene, de la producció i comercialització dels productes alimentaris.
- Reial decret 217/2004, del 6 de febrer, pel qual es regulen la identificació i registre dels agents, establiments i contenidors que intervenen en el sector lacti, i el registre dels moviments de la llet. (B.O.E. 19.02.2004).
- Reial Decret 1054/2003, de l'1 d'agost, pel qual s'aprova la Norma de qualitat per a determinats tipus de llet conservada parcial o totalment deshidratada destinats a l'alimentació humana. (B.O.E. 2003.08.02)

- Ordre del 20 d'octubre del 1983, per la qual s'aprova la Norma General de Qualitat per a la llet concentrada destinada al mercat interior. (B.O.E. 1983.10.24).

10.2. Especificacions microbiològiques

La regulació microbiològica de la llet d'euga es troba en el Reglament (CE) N° 853/2004, establint els següents paràmetres:

- Nombre de microorganismes permesos per a la llet crua d'altres espècies d'abast diferents a la vaca: $\leq 1.500.000$ unitats formadores de colònia (UFC) /mL (a 30°C). Ha de tractar-se d'una mesura geomètrica observada durant el període de dos mesos, amb un mínim de dues mostres al mes.

No obstant això, en el cas que es destini aquesta llet a la fabricació de productes realitzats amb llet crua mitjançant un procés que no impliqui cap tractament tèrmic, els operadors de l'empresa alimentària hauran d'adoptar mesures per garantir que la llet crua utilitzada no contingui un número de microorganismes igual o superior a 500.000 UFC/mL (a 30°C). Com en el cas anterior, ha de tractar-se d'una mesura geomètrica observada durant el període de dos mesos, amb un mínim de dues mostres al mes.

S'autoritza l'ús de llet crua que no compleixi els criteris establerts per a l'elaboració de formatges amb un cicle de maduració de 60 dies com a mínim i de productes lactis obtinguts en relació amb la fabricació d'aquests formatges. Aquests establiments realitzaran un control del magatzem de forma que es conegui i registri el temps de permanència de cada lot de productes per a garantir una estància mínima de 60 dies.

Es mantindran com a laboratoris de referència nacionals per a l'anàlisi de llet i productes lactis el Centre Nacional d'Alimentació, depenent de l'Agència Espanyola de Seguretat Alimentària, i el Laboratori Agroalimentari de Santander, depenent del Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació.

Quan els controls demostrin que en la granja d'origen la llet crua supera els paràmetres establerts pel que fa a la quantitat de microorganismes, l'autoritat competent ha d'enviar

una notificació al productor en què li comunicui que disposa d'un termini de tres mesos per corregir la situació. Passats els tres mesos, els productors que segueixin superant els esmentats paràmetres han de suspendre el lliurament de llet crua, o, d'acord amb una autorització de l'autoritat competent, han de lliurar aquesta llet, i informar d'aquesta situació els establiments que garanteixin els requisits de tractament i utilització que s'indiquen a continuació:

- L'elaboració de formatges amb un cicle de maduració de 60 dies com a mínim i productes lactis obtinguts en la fabricació dels esmentats formatges, amb la condició que els responsables dels establiments que elaborin aquests formatges realitzin un control de magatzem de forma que es conegui i registri el temps de permanència de cada lot de productes per garantir una estada mínima de 60 dies; o
- L'elaboració de productes lactis o productes a base de calostre a partir d'aquesta llet o calostre, una vegada hagin estat sotmesos a tractament tèrmic.

S'ha de mantenir l'esmentada suspensió o els esmentats requisits fins que el productor de la granja d'origen demostrï que la llet crua torna a ser conforme als criteris esmentats.

10.3. Tractaments tèrmics

En el cas que se sotmeti la llet, calostre o productes lactis a tractament tèrmic, el Capítol 2 del Reglament (CE) N° 853/2004, estableix aquells requisits que cal garantir per al seu correcte processament.

10.3.1. Pasteurització

La pasteurització es duu a terme mitjançant un tractament que inclou (i) una temperatura elevada durant un breu període de temps (almenys 72°C durant 15 segons) o (ii) una temperatura baixa durant un llarg període de temps (almenys 63°C durant 30 minuts), o bé (iii) qualsevol altra combinació de condicions de temps i temperatura amb la qual s'obtingui un efecte equivalent, de manera que, quan sigui procedent, els productes donin una reacció negativa a una prova de fosfatasa alcalina immediatament després de ser sotmesos a aquest tractament.

10.3.2. *Ultra High Temperature (UHT)*

La ultrapasteurització o uperització (UHT) es realitza mitjançant un tractament (i) en el qual s'aporti un flux de calor continu durant un breu període de temps (almenys 135°C durant un període de temps adequat) amb la finalitat que no quedin microorganismes o espores viables que puguin proliferar en el producte tractat mantingut en un recipient asèptic tancat a temperatura ambient, i (ii) que sigui suficient per garantir l'estabilitat microbiològica dels productes després d'un període d'incubació de 15 dies a 30°C en un recipient tancat, o de 7 dies a 55°C en un recipient tancat, o després de qualsevol altre mètode que demostrï que s'ha aplicat el tractament tèrmic apropiat.

OBJECTIUS I

PLA DE TREBALL



1. Objectius

Els cinc objectius principals d'aquesta Tesi doctoral i les seves corresponents hipòtesis de treball s'anomenen a continuació:

- Caracterització microbiològica de la llet d'euga al llarg de la gestació.
 - H_0 : La llet d'euga posseeix una microbiota que varia al llarg de la gestació.
 - H_1 : La llet d'euga no posseeix una microbiota que varia al llarg de la gestació.

- Caracterització enzimàtica de la llet d'euga al llarg de la gestació.
 - H_0 : La llet d'euga posseeix una activitat enzimàtica variable al llarg de la gestació.
 - H_1 : La llet d'euga no posseeix una activitat enzimàtica variable al llarg de la gestació.

- Avaluació del potencial probiòtic dels bacteris àcid làctics aïllats de la llet d'euga.
 - H_0 : La llet d'euga posseeix soques de bacteris àcid làctics potencialment probiòtics.
 - H_1 : La llet d'euga no posseeix soques de bacteris àcid làctics potencialment probiòtics.

- Avaluació de la capacitat antimicrobiana dels bacteris àcid làctics aïllats de la llet d'euga.
 - H_0 : Els bacteris àcid làctics d'origen equí són productors de substàncies capaces d'inhibir el creixement d'altres microorganismes no desitjables.

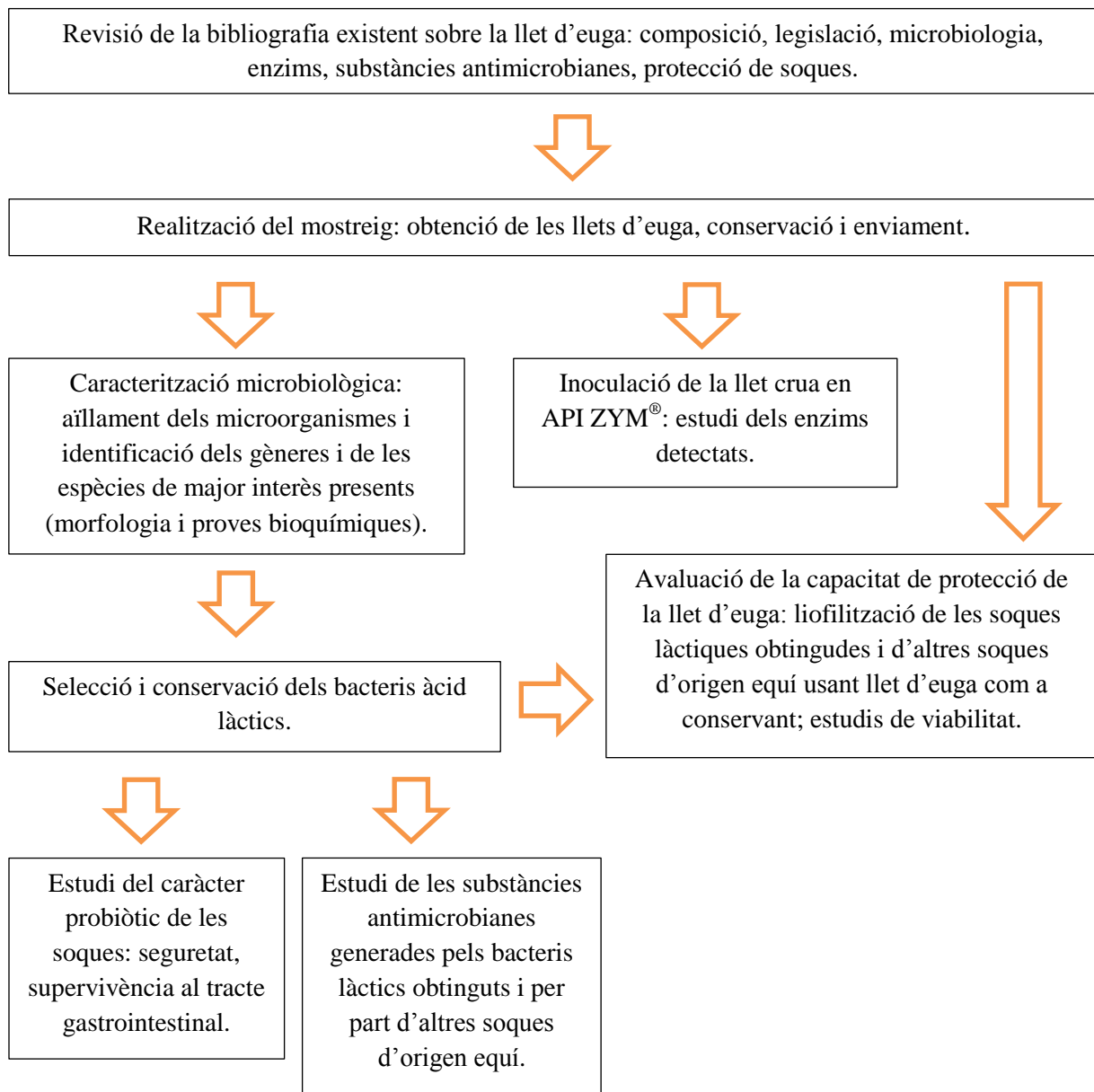
- H₁: Els bacteris àcid làctics d'origen equí no són productors de substàncies capaces d'inhibir el creixement d'altres microorganismes no desitjables.
- Avaluació de les propietats de la llet d'euga com a protector cel·lular per a bacteris àcid làctics equins sotmesos a processos de liofilització i posterior emmagatzemament.
 - H₀: La llet d'euga pot ser utilitzada per a la protecció de les soques de bacteris àcid làctics equins quan aquestes són sotmeses a processos de liofilització i conservació en sec.
 - H₁: La llet d'euga no pot ser utilitzada per a la protecció de les soques de bacteris àcid làctics equins quan aquestes són sotmeses a processos de liofilització i conservació en sec.

Els objectius específics d'aquesta investigació es mostren a continuació:

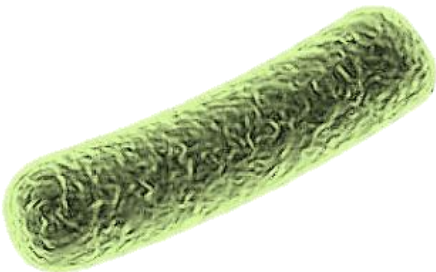
1. Aïllar i caracteritzar els diferents microorganismes de les llets crues de dues eugues al llarg de dues gestacions no consecutives.
2. Caracteritzar els perfils enzimàtics de les llets crues de dues eugues al llarg de dues gestacions no consecutives.
3. Aïllar soques dels diferents gèneres pertanyents al grup de bacteris àcid làctics a partir de llet d'euga.
4. Avaluar i seleccionar les soques de bacteris àcid làctics en base a diferents proves que ens permetin considerar-les com a probiòtiques.
5. Avaluar la capacitat antimicrobiana de soques de bacteris àcid làctics aïllats de llet i femtes equines.
6. Avaluar la capacitat de la llet d'euga per a mantenir la viabilitat de bacteris àcid làctics equins sotmesos a processos de liofilització i posterior emmagatzematge a durant 90 dies.

2. Pla de treball

El pla de treball desenvolupat es resumeix de forma esquemàtica a continuació.



MATERIALS I MÈTODES



1. Tècnica de mostreig

1.1. Origen de les mostres

Amb la finalitat d'avaluar les característiques microbiològiques, enzimàtiques i probiòtiques de la llet d'euga, es van escollir dues eugues procedents d'una explotació extensiva anomenada *Merens del Pedraforca*, situada al municipi de Saldes. Aquesta es troba al peu del Pedraforca, a la banda est de la muntanya, al bell mig de les Serres del Cadí i d'Ensija, a la comarca del Berguedà (Barcelona) (Imatges 5 i 6).



Imatge 5. Mapa de la localització de l'explotació Merens del Pedraforca. (2014) Google. De: <http://maps.google.es>



Imatge 6. Vista aèria de l'explotació Merens del Pedraforca.
(2014) Google. De: <http://maps.google.es>

Les dues eugues que es van escollir pertanyen a la raça Merens, originària de la Vall d'Arieja (Pirineu central), que es caracteritza per la seva força, calma, docilitat i facilitat per a desenvolupar treballs durs. A més de mostrar bona aptitud per ser mares són àgils, afectuoses i sociables (Imatge 7). Es troben en règim extensiu, amb una alimentació consistent en herba de prats de muntanya, amb suport de blat de moro a l'hivern, i farratge en cas de neu.



Imatge 7. Olivé, M. (2012). Detall de les dues eugues utilitzades per al mostreig de les llets juntament amb les seves cries, De: http://www.merensdelpedraforca.cat/wp-content/uploads/2012/03/grans_petits_1.jpg

1.2. Obtenció de les mostres

Per a l'obtenció de les mostres de llet es va procedir a la munyida manual de les eugues, la qual es va realitzar en la franja horària de matí, amb la presència del poltre per a estimular la baixada de la llet. Abans de la recollida, els mugrons es van netejar amb un drap net per tal de retirar el màxim de brutícia possible. No es va aplicar cap desinfectant, per evitar qualsevol acció bactericida sobre la mostra.

La llet obtinguda es va introduir en recipients estèrils de 100 mL de capacitat (Imatge 8) i es va congelar immediatament a -18°C . La quantitat de llet recollida per a l'estudi en cada mostreig va oscil·lar entre els 50 i els 80 mL. La llet es va transportar fins al laboratori d'anàlisi en bosses isotèrmiques amb geladores per tal de conservar el màxim possible la cadena de fred.



Imatge 8. Recipients per a la recollida de la llet d'euga.

Les llets es van recollir al llarg de tres anys, al llarg de dues de les tres gestacions que es van produir: 2012-2013 (1^a gestació), 2013-2014 (2^a gestació) i 2014-2015 (3^a gestació) (Taula 7):

- La primera gestació es va dur a terme amb recollida de llet (producte d'una anterior gestació) entre els mesos 8 i 11, però ambdues eugues no van arribar a termini d'aquesta, avortant als voltants del desè mes.
- La segona gestació va succeir amb normalitat però sense la possibilitat d'extreure llet degut a la manca de poltres de la primera gestació.
- La tercera gestació va transcórrer amb recollida de llet novament, aturant-se la lactació voluntàriament al vuitè mes per preparar les eugues pel part. Per aquesta raó la recollida es va dur a terme entre els mesos 1 i 8.

Data d'extracció	Nº gestació	Mes de gestació
1/01/2013	Primera	8è
4/02/2013	Primera	9è
7/03/2013	Primera	10è
2/04/2013	Primera	11è- avortament
Sense llet	Segona	-
5/05/2014	-	No gestant
30/06/2014	Tercera	1er
22/09/2014	Tercera	3er
21/10/2014	Tercera	4t
19/12/2014	Tercera	6è
13/01/2015	Tercera	7è
14/02/2015	Tercera	8è

Taula 7. Dies de la presa de mostres. Els dies varen ser els mateixos per a ambdues eugues.

2. Tècniques de caracterització microbiològica de la llet d'euga

2.1. Processament de les mostres

Per a l'anàlisi de les llets es van aplicar els protocols establerts per el grup de treball del Laboratori de Microbiologia Aplicada i Mediambiental del Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals de la Facultat de Veterinària (Universitat Autònoma de Barcelona).

2.1.2. Material necessari

- Columbia Agar Sang (Columbia Agar +5% Sheep Blood Ref: 67384, Bio-Rad Laboratories, USA).
- Agar Baird Parker (Baird Parker Agar Base ISO 6888-1Ref:610004, Liofilchem srl, Itàlia) + Suplement (Egg Yolk Tellurite Emulsion, ISO 6888-1, Ref: 80122, Liofilchem srl, Itàlia).
- Agar Triptona Soja (Tryptic Soy Agar, Ref: 610052, Liofilchem srl, Itàlia).
- Agar MacConkey (Mac Conkey Agar, Ref: 610028, , Liofilchem srl, Itàlia).
- Agar Man Rogosa Sharpe (MRS Agar ISO 15214, Ref: 610.024, Liofilchem srl, Itàlia).
- Agar Sabouraud (Sabouraud Dextrose Agar, Ref: 610103, Liofilchem srl, Itàlia).
- Agar Sulfit Polimixina Sulfadiazina (SPS AGAR, Ref:610148, Liofilchem srl, Itàlia).
- Agar Triptona Sulfit Neomicina (TSN) (Tryptone Sulfite Neomycin Agar, Liofilchem srl, Itàlia).

- Brou Man Rogosa Sharpe (MRS Broth ISO 15214, Ref: 610025, Liofilchem srl, Itàlia).
- Brou Fraser (Demi Fraser Broth, ISO 11290-1, Ref: 610091, Liofilchem srl, Itàlia).
- LMono Agar (RAPID *L.mono* Agar 355 5294, Bio-Rad laboratories, USA).
- Azide Dextrose Broth (Ref: 610003, Liofilchem srl, Itàlia).
- Agar (Ref: 611001, Liofilchem srl, Itàlia).
- Anaerocult A[®] (Ref: 1.13829.0001, Merk KGaA, Darmstadt, Alemanya).
- Marmita d'anaerobiosi.
- Micropipeta 100µL – 1000 µL (Ref: F123602, Gilson S.A.S, França).
- Micropipeta 20 µL -200 µL (Ref: F123601, Gilson S.A.S., França).
- Nansa de Kolle estèril.
- Nansa de Digrafsky estèril.
- Estufa de 37°C, 42°C i 28°C.

2.1.2. Metodologia

2.1.2.1. Sembra i incubació de les llets

Les llets es van descongelar deixant els recipients de recollida a temperatura ambient fins que van assolir una temperatura entre 20 i 25°C. Posteriorment es va procedir a la seva sembra en una diversitat àmplia de medis de cultiu per tal d'obtenir una avaluació microbiològica correcta.

Els medis de cultiu utilitzats, la quantitat inoculada i el tipus de sembra es van escollir en funció dels microorganismes presumptivament presents a la llet (Taula 8). La sembra en superfície es va realitzar inoculant 100 µL de llet en el medi pertinent (Imatge 8), repartint-la homogèniament mitjançant l'ús de nansa de Digrafsky estèril (Imatge 9). La sembra per inclusió es va dur a terme inoculant en placa de Petri estèril 1 mL de llet i afegint posteriorment el medi de cultiu, homogeneïtzant la barreja i deixant solidificar el medi. Per preparar una atmosfera anaeròbia es va usar el reactiu Anaerocult A[®], i es van introduir les plaques a l'interior d'una marmita d'anaerobiosi.

Les plaques es varen mantenir en les estufes pertinents, realitzant recomptes a les 24 i a les 48 hores d'incubació excepte les plaques de Sabouraud, les quals es van mantenir a l'estufa un total de set dies. Els pre-enriquiments es van mantenir a 37°C durant 24 hores; transcorregut aquest temps es va realitzar una sembra per esgotament en placa amb l'ajuda d'una nansa d'inoculació o nansa de Kolle estèril.



Imatge 8. Dipòsit d'una mostra de llet en una placa de cultiu amb Columbia Agar Sang amb l'ajuda d'una micropipeta i de puntes estèrils.



Imatge 9. Repartiment de la llet sembrada a una placa de Triptona Soja Agar amb l'ajuda d'una nansa de Digrafsky de vidre.

2.1.2.2. Aïllament de les colònies

Després de la incubació i el recompte de les plaques, es va dur a terme l'aïllament en placa de les colònies desenvolupades en cadascun dels medis de cultiu usant la tècnica de la sembra per esgotament amb l'ajuda de la nansa nansa de Kolle. La Imatge 10 mostra un aïllament d'una soca làctia en una placa de Petri.



Imatge 10. Placa de medi MRS agar amb una soca làctia sembrada per esgotament.

Medi de cultiu	Abreviatura	Tipus de sembra	Condicions incubació	Quantitat inoculada	Microorganismes detectables
Columbia Agar Sang	COS	Superfície	37°C	100 µL	Aerobis mesòfils
Baird Parker Agar	BP	Superfície	37°C	100 µL	<i>Staphylococcus aureus</i>
Triptona Soja Agar	TSA	Superfície	37°C, 37°C+ Anaerocult®	100 µL	Aerobis mesòfils, anaerobis mesòfils
MacConkey Agar	MC	Superfície	37°C, 42°C	100 µL	Enterobacteris totals, coliformes, <i>E. coli</i> , Enterobacteris d'origen fecal
Man Rogosa Sharpe Agar	MRS	Superfície	37°C, 37°C+5%CO ₂ , 37°C+ Anaerocult®	100 µL	Bacteris àcid làctics
Sabouraud Dextrose Agar	S	Superfície	28°C	100 µL	Fongs miceliars i llevats
Sulfite Polymixyn Sulfadiazine	SPS	Inclusió	37°C + 5%CO ₂	1 mL	Bacteris sulfit reductors
Tripticase Sulfite Neomycin	TSN	Inclusió	37°C + Anaerocult®	1 mL	<i>Clostridium perfringens</i>
Man Rogosa Sharpe Broth	MRSB	Inoculació	37°C, 37°C + 5%CO ₂	1 mL en 9 mL de caldo	Bacteris àcid làctics
Fraser + L Mono Agar	Lis	Preenriquiment 24h + aïllament en placa	37°C	5 mL en 50 mL de brou	<i>Listeria monocytogenes</i>
Azide Dextrose Broth + 15% Agar	AZ	Superfície	42°C	100 µL	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>

Taula 8. Resum dels medis, condicions d'incubació i microorganismes cercats en l'assaig.

2.2. Identificació dels cultius I. Morfologia.

Una vegada aïllats, es va procedir a diferenciar els cultius obtinguts d'acord amb les seves característiques morfològiques i bioquímiques bàsiques amb la finalitat d'identificar-los.

2.2.1. Característiques macroscòpiques

La Taula 9 ens mostra les característiques diferencials que presenten les colònies bacterianes i que ens permeten fer la primera diferenciació dels aïllaments obtinguts.

Forma	Puntiforme, circular, irregular, allargada, fusiforme, filamentosa, rizoide, etc.
Mida	Estimació del diàmetre de la colònia
Superfície	Llisa, rugosa, cerebriforme, en anella, concèntrica, etc.
Elevació	Aplanada, elevada, pulvinada, convexa, umbonada, umbilicada, etc.
Vora	Continua, ondulada, lobulada, erosionada, fistonejada, filamentosa, etc.
Estructura interna	Amorfa o granulosa
Color	Blanca, groga, vermella, taronja, etc.
Opacitat	Transparent, opaca.
Consistència	Dura, viscosa, membranosa, gelatinosa, mucosa, etc.

Taula 9. Principals característiques morfològiques macroscòpiques de les colònies bacterianes (adaptat de Granados i Villaverde, 2003).

2.2.2. Característiques microscòpiques

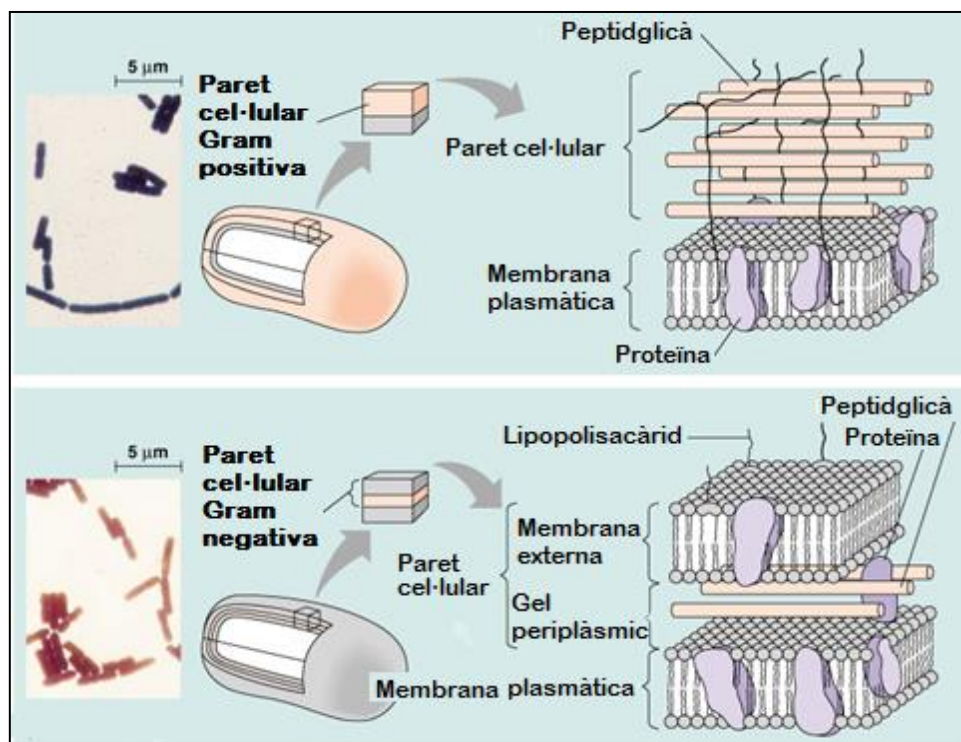
2.2.2.1. Tinció de Gram

2.2.2.1.1. Fonament

La tinció de Gram és una tècnica diferencial que permet l'observació morfològica dels microorganismes i la seva classificació en dos grups d'acord amb les característiques de la seva paret cel·lular (Imatge 11):

- Gram positius: Bacteris que presenten a la paret una capa gruixuda de peptidglicà.
- Gram negatius: Bacteris que presenten una capa més fina de peptidglicà i una capa lipopolisacàrida externa.

Aquesta tinció ens permet diferenciar les cèl·lules bacterianes, així com observar les diferents morfologies dels microorganismes (cocs, bacils, cocbacils, etc.) i les diverses disposicions bacterianes (cèl·lules aïllades, en cadenes, en raïms, tètades, etc.).



Imatge 11. Principals estructures diferencials dels bacteris Gram positius i Gram negatius (adaptat de Tortora *et al.*, 2007).

2.2.2.1.2. Material necessari

- Cultiu o cultius a assajar
- Nansa de Kolle.
- Violeta de genciana (Ref: 251765.1609, Panreac Química S.A., Espanya).
- Lugol (Ref: 251774.1608, Panreac Química S.A., Espanya).
- Safranina (Ref: 251622.1607, Panreac Química S.A., Espanya).
- Alcohol acetona (Ref: 251803.1209, Panreac Química S.A., Espanya).

- Portaobjectes (Ref: D100004, Deltalab S.L., Espanya).
- Oli d'immersió (Ref: 251002.1208, Panreac Química SAU, Espanya).
- Microscopi òptic (CX21, Olympus, EUA).

2.2.2.1.3. Tècnica i interpretació

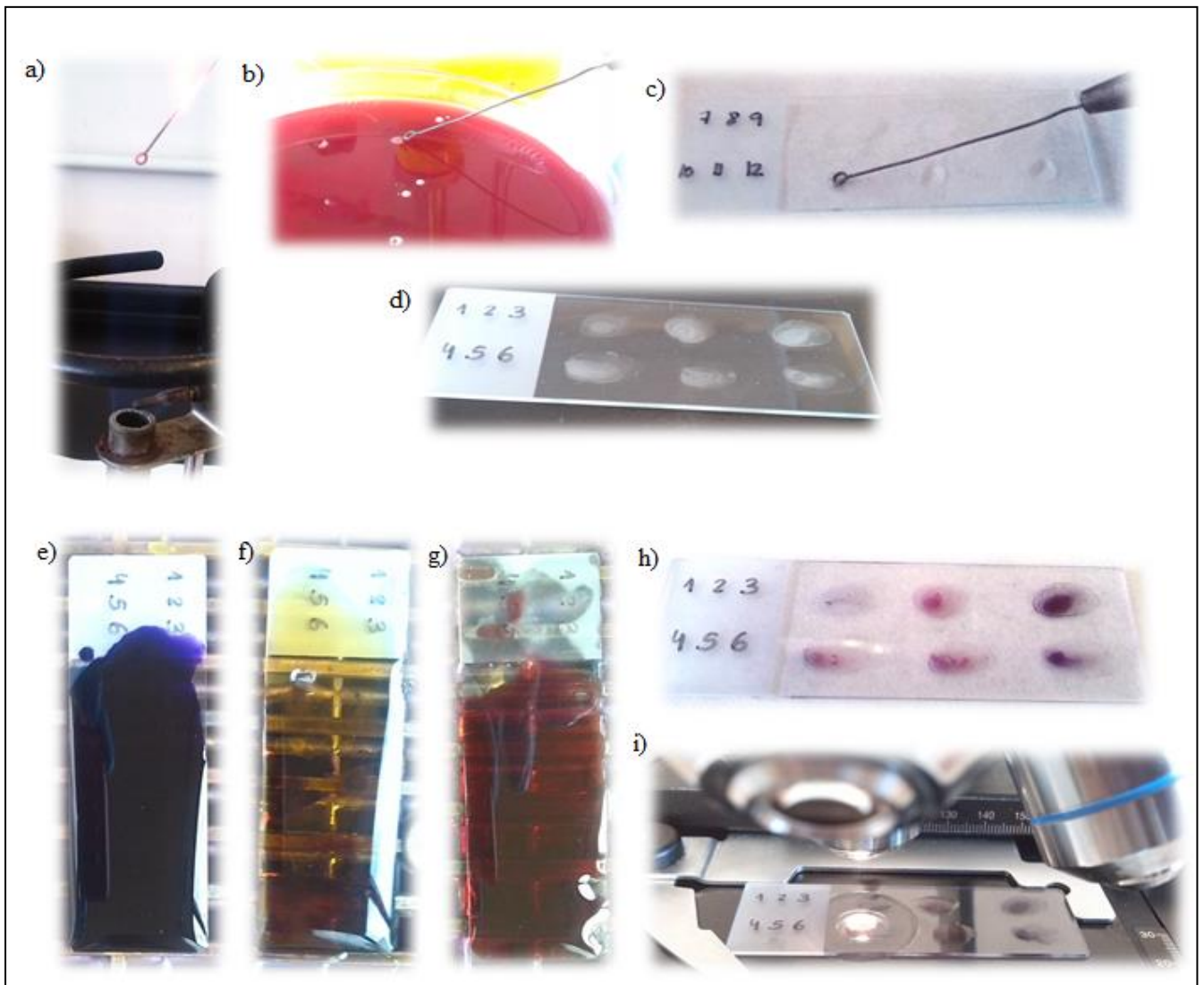
Sobre un portaobjectes net i desengreixat, es diposita una gota d'aigua destil·lada sobre la qual s'estén una porció de la colònia que es vol estudiar amb l'ajuda d'una nansa de Kolle estèril (Imatge 11 a, b i c), fixant-la amb l'escalfor suau d'una flama. La mostra ja estarà preparada per a la tinció (Imatge 11 d).

El primer pas consisteix en aplicar un primer colorant, el violeta de genciana, deixant-lo en contacte amb la mostra durant 2 minuts, el qual tenyeix totes les cèl·lules (Imatge 11 e).

A continuació es renta el portaobjectes amb aigua destil·lada per tal d'eliminar l'excés de colorant. Es cobreix amb lugol durant 1 minut, el qual actua com a mordent, incrementant la interacció entre la cèl·lula i el colorant (Imatge 11 f).

Posteriorment es decolora la mostra amb alcohol-acetona. Els bacteris Gram positius conservaran el color, mentre que els Gram negatius el perdran. Per últim s'afegeix un colorant de contrast, la safranina, que es deixa en contacte durant 2 minuts (Imatge 11 g)., afegint finalment aigua destil·lada per tal d'eliminar l'excés de colorant.

La mostra tenyida s'asseca a temperatura ambient o sota el calor suau d'una flama (Imatge 11 h)., i es procedeix a la seva observació sota el microscopi òptic a un augment de x1000 (Imatge 11 i), agregant prèviament oli d'immersió. Els bacteris Gram positius es veuran de color violeta, mentre que els Gram negatius es veuran de color rosat.



Imatge 11. Detall dels diferents processos de la tinció de Gram. a) Esterilització de la nansa de Kolle al bec Bunsen, b) Selecció de la colònia d'estudi amb nansa de Kolle, c) Suspensió de la colònia en aigua destil·lada sobre un cobreobjectes, d) Aspecte de les colònies fixades sobre el portaobjectes, e) Addició de violeta de genciana, f) Addició de lugol, g) Addició de safranina, h) Aspecte del portaobjectes una vegada finalitzada la tinció, i) Visualització de les colònies al microscopi òptic.

2.2.2.2. Tinció d'espores

2.2.2.2.1. Fonament

La tinció d'espores permet posar en evidència aquest tipus d'estructures especials, resistents i latents que es formen dins de les cèl·lules i que protegeixen els bacteris de les condicions ambientals adverses. Les formen alguns gèneres com *Bacillus* o *Clostridium*. Les soques del gènere *Lactobacillus* no en formen.



Imatge 12. Detall de la tinció d'espores. L'escalfor permet l'entrada del colorant dins l'esporeta.

Les espores no es tenyeixen amb els mètodes comuns com la tinció simple o la tinció de Gram, ja que els colorants emprats no són capaços de travessar les seves parets.

La tinció més usada amb aquesta finalitat és la tinció de *Schaeffer-Fulton* per a endòspores (Tortora *et al.*, 2007).

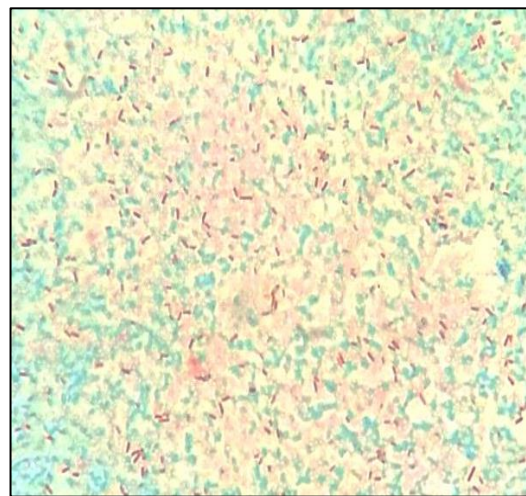
2.2.2.2.2. Material necessari

- Cultiu o cultius a assajar.
- Nansa de Kolle.
- Verd de Malaquita (Ref: 251761.1606, Panreac Química S.A., Espanya).
- Safranina O (Ref: 251622.1607, Panreac Química S.A., Espanya).
- Portaobjectes (Ref: D100004, Deltalab S.L., Espanya).
- Oli d'immersió (Ref: 251002.1208, Panreac Química SAU, Espanya).
- Microscopi òptic (CX21, Olympus, EUA).

2.2.2.2.3. Tècnica i interpretació

Sobre un portaobjectes net i desengreixat es diposita una gota d'aigua, sobre la qual s'estén una porció de la colònia a estudiar i posteriorment es fixa amb calor suau. La mostra es cobreix amb una paper de filtre de la mateixa mida del portaobjectes i es subjecta amb una pinça. A continuació, s'amara el paper amb verd de malaquita i s'exposa al calor suau per tal que hi hagi emissió de vapors (Imatge 12). L'escalfor ajuda a que el colorant travessi la paret de l'espore.

Quan la mostra deixa d'emetre els vapors, es torna a amarar el paper de filtre amb el colorant i s'exposa novament a la calor suau, repetint el procediment fins a cinc vegades. Finalment s'enretira el paper i es renta el preparat amb aigua durant uns 30 segons per a eliminar el colorant de totes les parts excepte de les espores. A continuació s'aplica sobre l'extensió safranina durant uns 30 segons, la qual serveix com a colorant de contrast, tenyint totes les porcions cel·lulars diferents a les espores. La preparació es deixa assecar a temperatura ambient o sota el calor suau de la flama.



Imatge 13. Observació al microscopi òptic d'una tinció d'espores positiva. Les espores bacterianes prenen un color verd, mentre que les cèl·lules vegetatives s'observen de color rosa.

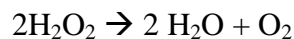
L'extensió s'observa sota el microscopi òptic, a un augment de x1000. Les espores apareixen de color verd i les cèl·lules vegetatives de color rosat (Imatge 13).

2.3. Identificació dels cultius II. Proves bioquímiques bàsiques.

2.3.1. Prova de la catalasa

2.3.1.1. Fonament

La prova de la catalasa permet comprovar la presència o absència d'aquest enzim, present en els bacteris aerobis i anaerobis facultatius. La respiració aeròbica normal produeix peròxid d'hidrogen, el qual és tòxic. Els bacteris han desenvolupat enzims per tal de neutralitzar-lo; entre aquests enzims el més comú és la catalasa, el qual el transforma en aigua i oxigen per la següent reacció:



Els bacteris àcid làctics són catalasa negatius ja que són majoritàriament anaerobis estrictes o anaerobis facultatius.

2.3.1.2. Material necessari

- Cultiu o cultius a assajar.
- Nansa de Kolle.
- Portaobjectes (Ref: D100004, Deltalab S.L., Espanya).
- Peròxid d'hidrogen al 10% (Ref. 121076.1410, Panreac Química S.A., Espanya).

2.3.1.3. Tècnica i interpretació

La catalasa es detecta amb facilitat per la seva acció sobre el peròxid d'hidrogen. Quan s'agrega una gota de peròxid d'hidrogen al 10% a una colònia de cèl·lules bacterianes productores de catalasa, s'alliberen bombolles d'oxigen. Aquest procediment es pot dur a terme a sobre d'un portaobjectes net.

2.3.2. Activitat hemolítica

2.3.2.1. Fonament

La mesura de l'activitat hemolítica d'una soca bacteriana posa de manifest la seva possible capacitat patògena, ja que demostra la presència d'antígens somàtics i/o flagel·lars capaços de trencar o lisar la membrana dels eritròcits i provocar l'alliberació de l'hemoglobina. Per aquesta raó, se seleccionen aquelles soques que no manifesten aquesta capacitat.



Imatge 14. Colònies beta hemolítiques en agar Columbia Sang. Al voltant de les colònies encerclades es pot observar la capacitat que presenten de lisar els eritròcits del medi.

2.3.2.2. Tècnica i interpretació

Per posar de manifest la capacitat hemolítica de les diferents soques se sembren en el medi de cultiu agar Columbia +5% de sang de xai (COS) (Ref: 43 041, bioMérieux, França). Una porció d'una colònia se sembra per esgotament amb l'ajuda d'una nansa de Kolle estèril. Les plaques s'incuben durant 24-48 hores a 37°C en les condicions de respiració corresponents (aerofília, anaerobiosi, 5% CO₂).

Transcorregut aquest temps s'observa el creixement (Imatge 14), el qual pot manifestar-se de tres formes diferents (Taula 10).

Tipus d'hemòlisi	Característiques
α hemòlisi o parcial	Clarificació parcial del medi de cultiu al voltant de la colònia, produint una coloració gris verdosa.
β hemòlisi o completa	Clarificació total del medi de cultiu al voltant de la colònia, eliminació de la sang del medi.
γ hemòlisi o no hemòlisi	Absència de clarificació del medi de cultiu al voltant de la colònia.

Taula 10. Caracterització de l'hemòlisi d'una colònia en agar Columbia Sang (adaptat de Cabello, 2007).

2.3.3. Identificació a nivell d'espècie mitjançant proves bioquímiques

La identificació bioquímica a nivell d'espècie de les soques aïllades de les llets es duu a terme mitjançant l'ús de sistemes miniaturitzats API[®] (bioMérieux SA, França), els quals contenen diferents substrats deshidratats que permeten la identificació específica de cada microorganisme.

2.3.3.1. Kit API 50 CH[®]

2.3.3.1.1. Fonament

Aquest sistema comercial estàndard permet la identificació de *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. i microorganismes pròxims.

Està compost per 49 assajos bioquímics (Taula 11) que permeten estudiar el metabolisme dels hidrats de carboni en microorganismes i determinen el patró de fermentació dels carbohidrats i derivats per part dels microorganismes (heteròsids, polialcohols, àcid urònic). La fermentació de substrats implica un canvi en el color en la cúpula que ve determinat per un indicador de pH incorporat en cada substrat.

Aquests assajos de fermentació es porten a terme en combinació amb un medi d'inoculació que rehidrata els substrats. Per a la identificació de bacteris àcid làctics s'utilitza el medi API 50 CHL Medium[®].

0	Control	10	Galactosa	20	alfa-Metil-D-manosida	30	Melibiosa	40	D-Turanosa
1	Glicerol	11	D-Glucosa	21	alfa-Metil-D-glucosid	31	Sucrosa	41	D-Lixosa
2	Eritritol	12	D-Fructosa	22	N-Acetil-glucosamina	32	Trehalosa	42	D-Tagatosa
3	D-arabinosa	13	D-Manosa	23	Amigdalina	33	Inulina	43	D-Fucosa
4	L-arabinosa	14	L-Sorbosa	24	Arbutina	34	Melezitosa	44	L-Fucosa
5	Ribosa	15	Rhamnosa	25	Esculina	35	D-Rafinosa	45	D-Arabitol
6	D-xilosa	16	Dulcitol	26	Salicina	36	Starch	46	L-Arabitol
7	L-xilosa	17	Inositol	27	Cellobiosa	37	Glicògen	47	Gluconat
8	Adonitol	18	Manitol	28	Maltosa	38	Xilitol	48	2-keto-gluconat
9	B-Metil-D-xylosida	19	Sorbitol	29	Lactosa	39	beta-Gentobiosa	49	5-keto-gluconat

Taula 11. Assajos bioquímics presents en el sistema comercial API 50 CH[®].

2.3.3.1.2. Material necessari

- *Kit* API 50 CH[®] (Ref: 50 300, bioMérieux SA, França).
- API 50 CHL Medium[®] (Ref: 50 410, bioMérieux SA, França).
- Micropipeta 100µL – 1000 µL (Ref: F123602, Gilson S.A.S, França).
- Oli de parafina estèril (Ref: 70 100, bioMérieux SA, França).
- Programari d'identificació Apiweb[™] (bioMérieux SA, França).

2.3.3.1.3. Metodologia

- Preparació de l'inòcul: a partir d'un cultiu axènic de 24 hores d'incubació, s'obté una alíquota que s'addiciona al medi API 50 CHL Medium[®].
- Preparació de la galeria: es prepara la cambra d'incubació, constituïda per una tapa i un fons, en el qual cal repartir 10 mL d'aigua destil·lada amb la finalitat de

generar una atmosfera humida entre els alvèols del fons. Posteriorment es disposen les proves bioquímiques a la cambra de forma ordenada.

- Inoculació de la galeria: Es reparteix la suspensió bacteriana en cadascun dels microtubs de la galeria amb l'ajut d'una micropipeta, evitant la formació de bombolles i no sobrepasant el límit dels tubs. Per a la identificació de bacteris àcid làctics, cal omplir posteriorment les cúpules de cada assaig amb oli de parafina estèril.
- Incubació: Les galeries es deixen entre 24 i 48 hores en estufa de $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Lectura: Transcorregut el temps d'incubació es procedeix a la lectura dels resultats, els quals s'interpreten com a positius, negatius o dubtosos (Imatge 15). Aquests resultats es transfereixen al programa informàtic d'identificació Apiweb™, subministrat per la casa comercial.



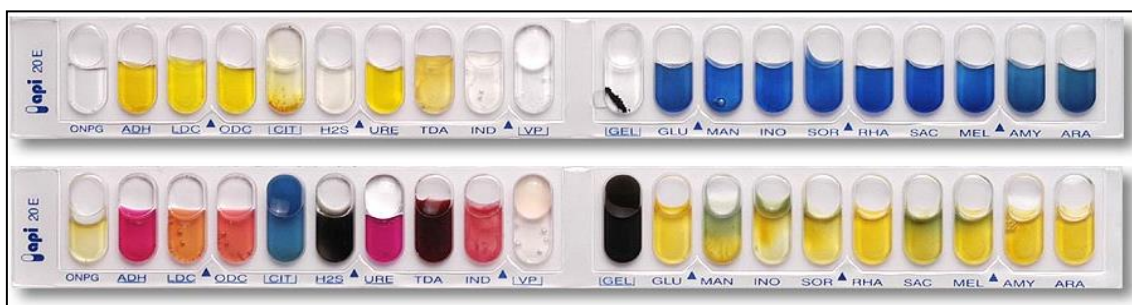
Imatge 15. Perfils negatius (esquerra) i positius (dreta) de les proves bioquímiques presents en l'API 50 CH® + API 50 CHL Medium® (De: <https://apiweb.biomerieux.com>).

2.3.3.2. *Kit API 20 E*[®]

2.3.3.2.1. Fonament

Aquest sistema comercial estàndard permet la identificació de bacteris que pertanyen a la família *Enterobacteriaceae* i altres bacils Gram negatius no exigents. Cada galeria està composta per 20 assajos bioquímics els quals són inoculats amb una suspensió bacteriana. Les reaccions produïdes durant la incubació es tradueixen en canvis de color, els quals són espontanis per a alguns assajos, i per altres són induïts mitjançant l'addició de reactius (Imatge 16).

Les lectures es porten a terme utilitzant una taula de lectura i la identificació s'obté amb l'ajut d'un catàleg analític o utilitzant el programari d'identificació.



Imatge 16. Perfil negatiu (a dalt) i positiu (a baix) de les proves bioquímiques presents en l'API 20 E[®]. (De: <https://apiweb.biomerieux.com>).

2.3.3.2.2. Material necessari

- *Kit API 20 E*[®] (Ref: 20 100 / 20 160, bioMérieux SA, França).
- Medi API Suspension Medium[®] 5 ml (Ref. 20 150, bioMérieux SA, França)
- Escala de McFarland Standard[®] (Ref. 70 900, bioMérieux SA, França).
- Micropipeta 100µL – 1000 µL (Ref: F123602, Gilson S.A.S, França).
- Oli de parafina estèril (Ref: 70 100, bioMérieux SA, França).
- Programari d'identificació Apiweb[™] (Ref: 40 011, bioMérieux SA, França).
- *Kit de reactius API 20 E*[®] (Ref: 20 120, bioMérieux SA, França).
- Reactiu oxidasa (Ref. 70 380, bioMérieux SA, França).

2.3.3.2.3. Metodologia

- Preparació de l'inòcul: a partir d'un cultiu axènic de 24 hores d'incubació, es prepara una suspensió del microorganisme amb una concentració de l'ordre de 0,5 a l'escala de McFarland[®] dins del medi API Suspension Medium[®]. S'emulsiona amb cura per aconseguir una suspensió bacteriana homogènia, la qual ha de ser utilitzada immediatament després de la seva preparació.
- Inoculació de la galeria: Utilitzant una micropipeta i puntes estèrils, s'inocula la suspensió bacteriana a la galeria evitant la formació de bombolles en el fons del tub. Usant la mateixa pipeta, s'omplen tant el tub com la cúpula de les proves CIT, VP i GEL amb la suspensió bacteriana. S'omple només el tub (i no la cúpula) de les altres proves, i es crea anaerobiosi en les proves d'ADH, LDC, ODC, H₂S i URE mitjançant la superposició d'oli de parafina estèril. Posteriorment es tanca la cambra d'incubació i s'incuba a 36°C ± 2°C durant 18-24 hores.
- Lectura de la galeria: una vegada transcorregut el període d'incubació es comprova si 3 o més reaccions són positives. En cas afirmatiu es procedeix a l'agregació dels reactius corresponents i a la lectura de la galeria (Taula 12). En cas contrari, s'incuba de nou durant 24 hores i posteriorment es realitza la lectura. La interpretació dels resultats es duu a terme mitjançant el programa informàtic d'identificació Apiweb[™], subministrat per la casa comercial.
- Proves suplementàries: De forma independent, cal realitzar el test de la oxidasa com a complement de l'API[®]. Aquesta prova es realitza sobre un portaobjectes net, on es col·loca un paper de filtre i on s'addiciona una porció de la colònia d'estudi amb una gota del reactiu tetrafenilendiamina. La reacció positiva produeix un color blau intens de forma immediata.

Prova	Reacció / Enzims	Resultat negatiu	Resultat positiu
ONPG	Beta galactosidasa	Incolor	Groc
ADH	Arginina deshidrolasa	Groc	Vermell o taronja
LDC	Lisina descarboxilasa	Groc	Vermell o taronja
ODC	Ornitina descarboxilasa	Groc	Vermell o taronja
CIT	Utilització del citrat	Verd	Blau fosc o turquesa
H₂S	Producció de H ₂ S	Sense precipitat negre	Precipitat negre
URE	Ureasa	Groc	Vermell o taronja
TDA	Triptòfan desaminasa	Groc	Marró - vermell
IND	Producció d'indol	Groc	Rosa o anell rosat
VP	Producció d'acetoïna (Voges-Proskauer)	Incolor	Rosa - vermell
GEL	Gelatinasa	Sense difusió	Difusió del pigment
GLU	Fermentació/oxidació de la glucosa	Blau o verd	Groc
MAN	Fermentació/oxidació de mannitol	Blau o verd	Groc
INO	Fermentació/oxidació d'inositol	Blau o verd	Groc
SOR	Fermentació/oxidació de sorbitol	Blau o verd	Groc
RHA	Fermentació/oxidació de ramnosa	Blau o verd	Groc
SAC	Fermentació/oxidació de sacarosa	Blau o verd	Groc
MEL	Fermentació/oxidació de melobiosa	Blau o verd	Groc
AMY	Fermentació/oxidació d'amigdalina	Blau o verd	Groc
ARA	Fermentació/oxidació d'arabinosa	Blau o verd	Groc
OXI	Citocrom oxidasa		

Taula 12. Resultats de les reaccions de les proves de API 20 E®.

2.3.3.3. Kit API Coryne®

2.3.3.3.1. Fonament

Aquest sistema comercial estàndard permet la identificació de bacteris corineformes. Cada galeria està composta per 20 microassajos que contenen substrats deshidratats per a la detecció d'activitats enzimàtiques o de fermentació de sucres. Els assajos enzimàtics s'inoculen amb una suspensió densa que rehidrata els substrats enzimàtics. Les reaccions produïdes durant la incubació es tradueixen en canvis de color, els quals

són espontanis per a alguns assajos, i per altres són induïts mitjançant l'addició de reactius.

Les lectures es porten a terme utilitzant una taula de lectura i la identificació s'obté amb l'ajut d'un catàleg analític o utilitzant el programari d'identificació.

2.3.3.3.2. Material necessari

- *Kit API Coryne*[®] (Ref: 20 900, bioMérieux SA, França) (conté API GP Medium 2 mL).
- Reactius: NIT 1 + NIT 2 (Ref: 70 442) , ZYM A (Ref: 70 494), ZYM B (Ref: 70 493), PYZ (Ref: 70 492).
- Oli de parafina estèril (Ref: 70100, bioMérieux SA, França).
- Peròxid d'hidrogen al 10% (Ref. 121076.1410, Panreac Química S.A., Espanya).
- Programari d'identificació Apiweb[™] (Ref: 40 011, bioMérieux SA, França).
- Micropipeta 100µL – 1000 µL (Ref: F123602, Gilson S.A.S, França).
- Hisop estèril (Ref: 310200, Deltalab S.L., Espanya).
- Medi API Suspension Medium[®] 5 ml (Ref. 20 150, bioMérieux SA, França).
- Escala de McFarland Standard[®] (Ref. 70 900, bioMérieux SA, França).

2.3.3.3.3. Metodologia

- Preparació de l'inòcul: a partir d'un cultiu axènic de 24 hores d'incubació, es prepara una suspensió del microorganisme amb una concentració superior al patró 6 de l'escala de McFarland[®] dins del medi API Suspension Medium[®].
- Inoculació de la galeria: Utilitzant una micropipeta i puntes estèrils, s'inocula la suspensió bacteriana a les onze primeres proves de la galeria evitant la formació de bombolles en el fons del tub. Les deu primeres s'omplen els tubs, mentre que a la prova GEL s'omple el tub i la cúpula. A les nou últimes proves s'introdueix una barreja homogènia de 0,5 mL procedents de la suspensió utilitzada anteriorment dins d'una ampolla de API GP Medium[®]. Les cúpules de les proves marcades URE, 0 a GLYG s'omplen amb oli de parafina estèril.

- Lectura de la galeria: Després de la incubació s'agreguen els reactius i s'espera 10 minuts abans de llegir totes les reaccions (Taula 13). Els resultats s'introdueixen en el programa informàtic d'identificació Apiweb™, subministrat per la casa comercial.

Assaig	Reacció / Enzims	Resultat negatiu	Resultat positiu
NIT	Reducció de nitrats	Incolor	Rosa intens
PYZ	Pirazinamidasa	Incolor	Marró o taronja
PYRA	Pirolidonil arilamidasa	Incolor	Taronja
PAL	Fosfatasa alcalina	Incolor	Púrpura
βGUR	β-glucoronidasa	Incolor	Blau
βGAL	β-galactosidasa	Incolor	Blau
αGLU	α-glucosidasa	Incolor	Púrpura
βNAG	N-acetil-β-glucosaminidasa	Incolor	Marr
ESC	β-glucosidasa (esculina)	Incolor	Negre
URE	Ureasa	Groc - taronja	Vermell-Rosa
GEL	Gelatinasa	Sense difusió	Difusió del pigment
GLU	Fermentació/oxidació de la glucosa	Vermell - taronja	Groc
RIB	Fermentació/oxidació de ribosa	Vermell - taronja	Groc
XYL	Fermentació/oxidació de xilosa	Vermell - taronja	Groc
MAN	Fermentació/oxidació de manitol	Vermell - taronja	Groc
MAL	Fermentació/oxidació de maltosa	Vermell - taronja	Groc
SAC	Fermentació/oxidació de sacarosa	Vermell - taronja	Groc
LAC	Fermentació/oxidació de lactosa	Vermell - taronja	Groc
GLYG	Fermentació/oxidació glicogen	Blau o verd	Groc
CAT	Catalasa	Absència de bombolles	Presència de bombolles

Taula 13. Resultats de les reaccions de les proves de API Coryne®.

.2.3.3.4. Kit API Strep®

2.3.3.4.1. Fonament

Aquest sistema comercial estandarditzat permet realitzar un diagnòstic de grup o per espècie de la major part dels estreptococs, enterococs i altres microorganismes emparentats. La galeria conté 20 substrats deshidratats per a la detecció d'activitats enzimàtiques o de fermentació de sucres, els quals es reconstitueixen amb una suspensió d'un cultiu pur. Les reaccions que es produeixen durant el període d'incubació es tradueixen en variacions de coloració espontànies o revelades mitjançant l'addició de reactius.

2.3.3.4.2. Material necessari

- *Kit API Strep®* (Ref: 20 600, bioMérieux SA, França) (conté API GP Medium 2 mL).
- Reactius: NIN (Ref: 70 70 491) , ZYM A (Ref: 70 494), ZYM B (Ref: 70 493), VP1 + VP2 (Ref: 70 422).
- Oli de parafina estèril (Ref: 70 100, bioMérieux SA, França).
- Programari d'identificació Apiweb™ (Ref: 40 011, bioMérieux SA, França).
- Micropipeta 100µL – 1000 µL (Ref: F123602, Gilson S.A.S, França).
- Hisop estèril (Ref: 310200, Deltalab S.L., Espanya).
- Medi API Suspension Medium® 5 ml (Ref. 20 150, bioMérieux SA, França).
- Escala de McFarland Standard® (Ref. 70 900, bioMérieux SA, França).
- Marmita d'anaerobiosi i Anaerocult A® (Ref: 1.13829.0001, Merk KGaA, Darmstadt, Alemanya).

2.3.3.4.3. Metodologia

- Preparació de l'inòcul: a partir d'un cultiu axènic de 24 hores d'incubació, es prepara una suspensió del microorganisme amb una terbolesa de l'ordre de 4 a l'escala de McFarland[®] dins del medi API Suspension Medium[®]. S'emulsiona amb cura per aconseguir una suspensió bacteriana homogènia, la qual ha de ser utilitzada immediatament després de la seva preparació.
- Inoculació de la galeria: Amb l'ajuda d'una micropipeta i puntes estèrils, en la primera meitat de la galeria, s'inoculen els tubs amb la suspensió bacteriana evitant la formació de bombolles en el fons d'aquesta. La segona part s'inocula amb una barreja homogènia de 0,5 mL procedents de la suspensió utilitzada anteriorment dins d'una ampolla de API GP Medium[®]. S'inoculen els tubs i es crea anaerobiosi en la prova ADH de la primera meitat i en tota la segona meitat de la galeria, mitjançant la superposició d'oli de parafina estèril. Posteriorment es tanca la cambra d'incubació i s'incuba a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durant 4 – 4,5 hores per a una primera lectura i 24 hores (± 2 hores) per a una segona.
- Lectura de la galeria: una vegada transcorregut el període d'incubació es procedeix a l'agregació dels reactius corresponents i a la lectura de la galeria (Taula 14). En cas que sigui necessària una reincubació, es fa una segona lectura a les 24 hores. La interpretació dels resultats es duu a terme mitjançant el programa informàtic d'identificació Apiweb[™], subministrat per la casa comercial.

Assaig	Reacció / Enzims	Resultat negatiu	Resultat positiu
VP	Producció d'acetoïna (Voges-Proskauer)	Incolor	Rosa - vermell
HIP	Hidròlisi àcid hipúric	Incolor	Blau fosc o violeta
ESC	β -glucosidasa (esculina)	Incolor	Negre o gris
PYRA	Pirolidonil arilamidasa	Incolor	Taronja
αGAL	α -galactosidasa	Incolor	Violeta
βGUR	β -glucuronidasa	Incolor	Blau
βGAL	β -galactosidasa	Incolor	Violeta
PAL	Fosfatasa alcalina	Incolor	Violeta
LAP	Leucina aminopeptidasa	Incolor	Taronja
ADH	Arginina deshidrolasa	Groc	Vermell o taronja
RIB	Acidificació de ribosa	Vermell - taronja	Groc
ARA	Acidificació de arabinosa	Vermell - taronja	Groc
MAN	Acidificació de manitol	Vermell - taronja	Groc
SOR	Acidificació de sorbitol	Vermell - taronja	Groc
LAC	Acidificació de lactosa	Vermell - taronja	Groc
TRE	Acidificació de trehalosa	Vermell - taronja	Groc
INU	Acidificació d'inulina	Vermell - taronja	Groc
RAF	Acidificació de rafinosa	Vermell - taronja	Groc
AMD	Acidificació de midó	Vermell - taronja	Groc
GLYG	Fermentació/oxidació glicogen	Blau o verd	Groc

Taula 14. Resultats de les reaccions de les proves de API 20 E®.

2.4. Conservació de les soques aïllades

Amb la finalitat de conservar les soques obtingudes de les mostres de llet d'euga, es van emprar dues metodologies: la crioconservació i la liofilització.

2.4.1. Crioconservació

2.4.1.1. Fonament

La crioconservació o criopreservació consisteix en el manteniment dels microorganismes a temperatures inferiors a zero graus centígrads. Es basa en la paralització del metabolisme cel·lular per la disminució de l'aigua disponible.

Els cultius es conserven en criovials estèrils Cryoinstant[®], els quals contenen unes perles químicament tractades suspeses en una solució preservant criogènica on romanen els microorganismes que es volen preservar (Imatge 17).

2.4.1.2. Material necessari

- Cultiu o cultius a preservar, en placa d'agar, axènics.
- Hisops estèrils (Ref: 310200, Deltalab S.L., Espanya).
- Criovials Cryoinstant[®] (Ref:409113/6, Deltalab S.L., Espanya).
- Micropipeta 100µL – 1000 µL (Ref: F123602, Gilson S.A.S, França).
- Congelador de -80°C.

2.4.1.3. Metodologia

Es recull un cultiu pur jove (de menys de 24 hores d'incubació) del microorganisme a preservar amb una nansa o un hisop estèril i s'inocula directament al vial Cryoinstant[®]. Se substitueix la tapa i s'emulsiona invertint el pot 4-5 vegades perquè els microorganismes s'uneixin a la superfície porosa de les perles. Amb l'ajuda d'una pipeta, s'elimina la major quantitat de solució crioconservant possible i es torna a tancar el vial. Es registren els detalls del seu contingut al vial. Es col·loquen els criovials en un bloc i es porten al congelador. La temperatura ideal d'emmagatzematge és d'entre -60°C i -80°C.

Per tal de recuperar els cultius, cal treure el vial Cryoinstant[®] del congelador i extreure ràpidament una perla des del vial per mitjà d'una agulla o pinces estèrils. Per evitar la descongelació del vial, es pot utilitzar neu de diòxid de carboni o, alternativament, transportar dels vials en un bloc de parafina congelada. La crioperla extreta es diposita en un brou de cultiu adequat al microorganisme, s'incuba durant 24 hores i després es passa a medi sòlid.



Imatge 17. Criovials i caixa per a la seva preservació en fred.

2.4.2. Liofilització

2.4.2.1. Fonament

La liofilització és un mètode d'asseccament que permet la conservació d'algunes propietats dels productes com la bioactivitat, el sabor o l'olor entre d'altres (Imatge 18).

Es tracta d'un procés mitjançant el qual s'elimina un solvent a partir d'un material congelat o solució congelada mitjançant la sublimació del solvent i per la desorció del solvent absorbit, en general sota pressió reduïda.



Imatge 18. Liofilitzador processant uns vials.

Aquest procés implica les tres etapes següents: congelació, assecat primari i assecat secundari (Boss *et al.*, 2004). D'aquesta forma s'aconsegueix mantenir l'estabilitat de les mostres, evitant la contaminació microbiana.

Per a realitzar aquest procés es pot utilitzar el liofilitzador a una temperatura del col·lector de -55°C a 0,06 mbar de pressió.

2.4.2.2. Material necessari

- Cultiu o cultius líquids a preservar, axènics.
- Vials de 4 mL de capacitat transparents (Ref: 212FIB16040, Sudelab, Espanya).
- Taps de goma de butil (Ref: 212CC916, Sudelab, Espanya).
- Liofilitzador (Alpha 1-2 LD, Ref: 101021, Fisher Scientific S.L., Espanya).
- Micropipeta 100 μL – 1000 μL (Ref: F123602, Gilson S.A.S, França).
- Congelador de -80°C .

2.4.2.3. Metodologia

Es parteix d'un *overnight* d'un cultiu líquid pur de la mostra a liofilitzar, preferiblement crescut en tubs de fons cònic especials per a centrífuga. Se centrifuguen els tubs a 5000 rpm durant 10 minuts. Es descarta la fase líquida, conservant la fase sòlida o *pellet*.

Aquesta última es suspèn en 2 mL d'una solució crioconservant (per exemple, una suspensió consistent en un 15% de llet descremada i un 4% de sacarosa autoclavada a 115°C durant 13 minuts), distribuïnt-se en vials estèrils de vidre i introduint taps de goma especials per vials de forma que permetin una correcta sortida dels productes gasosos de la sublimació. Posteriorment, es col·loquen en el suport del liofilitzador i es preserven a -20°C durant 4 hores o fins a la seva congelació total.

Transcorregut aquest període de temps, es col·loca el suport dins del liofilitzador, assegurant la correcta formació del buit dins d'aquest, així com l'assoliment i

manteniment de la temperatura de liofilització. La durada del procés pot variar depenent de la quantitat de liòfils que es vulguin obtenir, deixant-se habitualment entre 24 i 48 hores.

Un cop finalitzat i si el nostre suport ho permet, es tanquen els taps de goma dins el liofilitzador per tal que el contingut quedi segellat al buit, evitant la contaminació per l'aire extern. Seguidament es retiren els vials del liofilitzador i del suport, es comprova que l'estat d'asseccament dels vials sigui el correcte, i es procedeix a la seva encapsulació. Els liòfils es mantenen a temperatura ambient o en refrigeració a 4°C, evitant l'exposició directa a la llum.

Per tal de recuperar els cultius cal reconstituir els vials amb un brou de cultiu adequat per al microorganisme determinat (Imatge 19), incubant-lo 24 hores, o bé reconstituint el vial amb 2 mL de brou de cultiu i realitzant una sembra en placa si es necessita determinar la concentració de cèl·lules viables del cultiu.



Imatge 19. Reconstitució d'un vial liofilitzat amb medi de cultiu líquid.

3. Tècniques de caracterització enzimàtica de la llet d'euga

3.1. Processament de les mostres

En aquest estudi es van analitzar els perfils enzimàtics de les llets crues d'euga i es van comparar amb els perfils obtinguts de les llets crues de truja i de vaca. Les llets es van descongelar deixant els recipients de recollida a temperatura ambient fins que van assolir una temperatura entre 20 i 25°C.

3.1.1. *Kit API ZYM*[®]

3.1.1.1. Fonament

Els perfils enzimàtics s'assagen mitjançant el mètode semiquantitatiu *API ZYM*[®]. Aquest assaig ens permet obtenir una mesura indirecta de l'activitat enzimàtica mitjançant la quantificació dels productes resultants de la seva acció. A continuació es detallen els 19 enzims constitutius detectables mitjançant aquest anàlisi, així com les abreviacions emprades en l'estudi (Taula 15).

Enzims API ZYM [®]			
1	Fosfatasa alcalina (FAL)	11	Naftol-AS-bi-fosfohidrolasa (NFH)
2	Esterasa (C:4) (EC4)	12	α -galactosidasa (α GAL)
3	Esterasa lipasa (C:8) (ELC8)	13	β -galactosidasa (β GAL)
4	Lipasa (C:14) (LC14)	14	β -glucuronidasa (β GLUN)
5	Leucina arilamidasa (LEUA)	15	α -glucosidasa (α GLUC)
6	Valina arilamidasa (VALA)	16	β -glucosidasa (β GLUC)
7	Cistina arilamidasa (CISA)	17	N-acetil- β -glucosaminidasa (NABG)
8	Tripsina (TRP)	18	α -manosidasa (α MAN)
9	α -quimotripsina fosfohidrolasa (QFH)	19	α -fucosidasa (α FUC)
10	Fosfatasa àcida (FAC)		

Taula 15. Enzims detectables mitjançant l'ús de API ZYM[®].

3.1.1.2. Material necessari

- Mostres de llet crua líquida a estudiar, a temperatura ambient.
- *Kit* API ZYM[®] (Ref: 25 200, bioMérieux SA, França).
- Reactiu Zym-A[®] (Ref: 70 494, bioMérieux SA, França).
- Reactiu Zym-B[®] (Ref: 70 493, bioMérieux SA, França).

3.1.1.3. Metodologia

El protocol utilitzat en la realització d'aquest assaig és una modificació de l'aportat pel fabricant.

- Preparació i inoculació de la galeria: Amb l'ajut d'una micropipeta es dispensen 65 microlitres de llet crua de euga en cada microtub (també anomenat cúpula, on es troben els substrats semisintètics) i s'incuben a 37°C. Transcorregudes entre 4 hores – 4 hores 30 min, s'addiciona una gota dels reactius Zym-A[®] i Zym-B[®]. El fet de posar en cada cúpula un agent tensioactiu (reactiu Zym-A[®]) permet facilitar la solubilització del reactiu Zym-B[®] en el medi. Posteriorment les galeries es deixen

mínim durant 5 minuts perquè es desenvolupi el color. Després si és possible s'exposa la galeria 10 segons sota una font de llum de gran abast a una distància de 10 cm per sobre de les cúpules. D'aquesta forma s'elimina el fons groc i les reaccions negatives esdevenen incolores (Imatge 20).



Imatge 20. API ZYM[®] inoculat amb llet d'euga, incubat 24 hores i amb els reactius ZymA[®] i ZymB[®] en el seu interior, a punt per a la seva lectura.

- Lectura de la galeria: Aquest micromètode semiquantitatiu permet fer una aproximació de la quantitat de nanomols de substrat hidrolitzats per cadascun dels enzims assajats. Valors des de 0 (reacció negativa) fins a 5 (màxim de reacció) s'assignen a cada reacció segons la seva intensitat de color, usant l'escala proposada pel fabricant. Les reaccions que donen una lectura superior a 0,5 (2,5 nanomoles) es consideren positives mentre que una lectura de 0 es considera com a negativa / sense activitat. Les aproximacions realitzades segons la metodologia es detallen a la Taula 16 i 17.

Escala API ZYM® colorimètrica	Nanomols de substrat hidrolitzats
0,5	2,5
1	5
2	10
3	20
4	30
5	≥40

Taula 16. Interpretació de resultats colorimètrics de API ZYM®. Les intensitats de color corresponen a diferents graus d'hidròlisi del substrat per part de l'enzim assajat.

>40 nanomoles	5																				
30 nanomoles	4																				
20 nanomoles	3																				
10 nanomoles	2																				
5 nanomoles	1																				
0 nanomole	0																				
Quantitat de substrat hidrolitzat Quantity of hydrolyzed substrate	Activitat numèrica Activity mark	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
		Control - Téimon	2 - naphthyl - phosphate	2 - naphthyl - butyrate	2 - naphthyl - caprylate	2 - naphthyl - myristate	L - leucyl - 2 - naphthylamide	L - valyl - 2 - naphthylamide	L - cystyl - 2 - naphthylamide	N - benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide	N - glucaryl-phenylalanine-2-naphthylamide	2 - naphthyl - phosphate	Nachhol-A5-B-glycophosphate	6-Br-2-naphthyl-α-D-galactopyranosida	2-naphthyl-10D-palmitoylpyranosida	Nachhol-A5-Bi-3D-glucuronide	2-naphthyl-3D-glucopyranosida	6-Br-2-naphthyl-10D-glucopyranosida	1-naphthyl-N-acetyl-3D-glucosaminida	6-Br-2-naphthyl-α-D-mannopyranosida	2-naphthyl-2L-fucopyranosida

Taula 17. Escala colorimètrica aportada pel fabricant (bioMérieux SA, França).

4. Avaluació del potencial probiòtic de bacteris àcid làctics equins

Per tal de seleccionar potencials probiòtics de la llet d'euga, així com de valorar el potencial probiòtic d'altres soques procedents del tracte gastrointestinal d'euga i de poltre, es van avaluar 11 soques de bacteris àcid làctics seguint les *Directrius per a l'Avaluació dels Probiòtics en els Aliments*, elaborades conjuntament per l'Organització de les Nacions Unides per a l'Agricultura i l'Alimentació (FAO) i per l'Organització Mundial de la Salut (OMS) el 2002.

4.1. Característiques macroscòpiques i microscòpiques dels cultius

4.1.1. Característiques macroscòpiques

Per tal d'obtenir bacteris àcid làctics de les llets d'euga, aquestes se sembren en medi MRS, tant en brou de cultiu com en agar, tal i com es detalla en l'apartat 2 d'aquesta secció. Tots els cultius avaluats com a possibles probiòtics es van obtenir de cultius purificats procedents d'aquestes sembres.

4.1.2. Característiques microscòpiques

Els cultius purs se sotmeten a tinció de Gram, seleccionant-se aquelles colònies Gram positives que presenten morfologia bacil·lar o de coc, no formadores d'espores.

4.2. Proves bioquímiques bàsiques

Les soques se sotmeten a les proves de la catalasa, oxidasa, i hemòlisi, seleccionant aquelles que siguin catalasa i oxidasa negatius, descartant aquells cultius que presentin β -hemòlisi, i donant prioritat a aquells que presentin γ -hemòlisi. Posteriorment, es procedeix a identificar els cultius amb l'ajuda del *kit* API 50 CH[®] + 50 CHL Medium[®] (vegeu apartat 2.3.3 d'aquesta secció).

4.3. Avaluació de la seguretat de les soques probiòtiques

4.3.1. Anàlisi de sensibilitat als antibiòtics

4.3.1.1. Fonament

Es tracta d'una tècnica fenotípica de difusió per a l'estudi de la sensibilitat in vitro dels bacteris enfront als antibiòtics.

4.3.1.2. Material necessari

- Cultius líquids de les soques a avaluar.
- Discs antibiòtics per a antibiograma:
 - Ampicil·lina (Ref: 9006, Liofilchem srl, Itàlia).
 - Kanamicina (Ref: 9027, Liofilchem srl, Itàlia).
 - Clindamicina (Ref: 9047, Liofilchem srl, Itàlia).

- Vancomicina (Ref: 9045, Liofilchem srl, Itàlia).
- Estreptomicina (Ref: 9040, Liofilchem srl, Itàlia).
- Tetraciclina (Ref: 9043, Liofilchem srl, Itàlia).
- Gentamicina (Ref: 9026, Liofilchem srl, Itàlia).
- Eritomicina (Ref: 9024, Liofilchem srl, Itàlia).
- Cloramfenicol (Ref: 9022, Liofilchem srl, Itàlia).
- Tilosina (Ref: 9082, Liofilchem srl, Itàlia).
- Antibiòtics en pols:
 - Ampicil·lina (Ref: A9393-5G, Sigma-Aldrich Inc., USA).
 - Kanamicina (Ref: A1493,0005, Panreac Química S.A., Espanya).
 - Clindamicina (Ref: C5269-10MG, Sigma-Aldrich Inc., USA).
 - Vancomicina (Ref: A1839,0001, Panreac Química S.A., Espanya).
 - Estreptomicina (Ref:S6501-5G, Sigma-Aldrich Inc., USA).
 - Tetraciclina (Ref: A2228,0025, Panreac Química S.A., Espanya).
 - Gentamicina (Ref: A1492,0001, Panreac Química S.A., Espanya).
 - Eritomicina (Ref: A2275,0005, Panreac Química S.A., Espanya).
 - Cloramfenicol (Ref: C0378-5G, Sigma-Aldrich Inc., USA).
 - Tilosina (Ref: T2880000, Sigma-Aldrich Inc., USA).
- Plaques de Petri de 90 mm de diàmetre amb 20 mL d'agar Mueller Hinton (Ref: 4017402, Biolife S.r.l., Milà, Itàlia).
- Ringer Powder (Ref: 06-073, Sharlab S.L., Barcelona, Espanya).
- Escala de McFarland Standard[®] (Ref: 70 900, bioMérieux SA, França).
- Agar Man Rogosa Sharpe (MRS agar ISO 15214, Ref: 610.024, Liofilchem srl, Itàlia).
- Brou MRS (MRS Broth ISO 15214, Ref: 610025, Liofilchem srl, Itàlia).
- Tubs d'assaig estèrils.
- Filtres esterilitzants (Ref: JPES022025K, Filter Lab[®], Barcelona, Espanya).
- Càmera de Neubauer (Ref: BR717810-1EA, Sigma-Aldrich Co., USA).

4.3.1.3. Metodologia

Els BAL aïllats i seleccionats s'enfronten a 10 antibiòtics (Taula 18) que se seleccionen seguint les directrius de la *Guia per a l'avaluació de la susceptibilitat bacteriana a antimicrobians d'importància humana i veterinària*, elaborada per la Comissió Tècnica d'Additius i Productes o Substàncies emprades en l'Alimentació Animal (FEEDAP) de l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA), basat en les dades publicades pel Comitè Europeu de Proves de susceptibilitat antimicrobiana (EUCAST), i dels programes nacionals i europeus de supervisió (EFSA, 2012).

	Ampicil·lina	Vancomicina	Gentamicina	Kanamicina	Estreptomicina	Eritromicina	Clindamicina	Tetraciclina	Cloramfenicol	Tilosina
<i>Lactobacillus homofermentatius</i>	1	2	16	16	16	1	1	4	4	n.r.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1	2	16	64	16	1	1	4	4	n.r.
<i>Lactobacillus heterofermentatius obligats</i>	2	n.r.	16	32	64	1	1	8	4	n.r.
<i>Lactobacillus reuteri</i>	2	n.r.	8	64	64	1	1	16	4	n.r.
<i>Lactobacillus heterofermentatius facultatiu</i>	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4	n.r.
<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	2	n.r.	16	64	n.r.	1	1	32	8	n.r.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4	n.r.	16	64	32	1	1	8	4	n.r.
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	4	n.r.	32	64	64	1	1	4	4	n.r.
<i>Bifidobacterium</i> spp.	2	2	64	n.r.	128	1	1	8	4	n.r.
<i>Pediococcus</i> spp.	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4	n.r.
<i>Leuconostoc</i> spp.	2	n.r.	16	16	64	1	1	8	4	n.r.
<i>Lactococcus lactis</i>	2	4	32	64	32	1	1	4	8	n.r.
<i>Enterococcus faecium</i>	2	4	32	1024	128	4	4	4	16	4

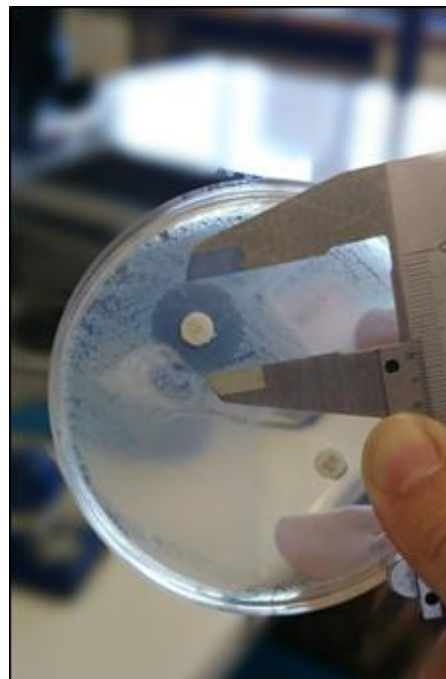
Taula 18. Antibiòtics requerits per la EFSA per a avaluar la seguretat de soques potencialment probiòtiques (EFSA, 2012). Els valors de tall s'expressen en mg/L. n.r.= no requerit.

4.3.1.3.1. Primer *screening*: Mètode de difusió en disc

Les soques BAL es sotmeten primerament a un assaig de difusió en placa mitjançant l'ús de discs de susceptibilitat antimicrobiana sobre plaques d'agar Mueller Hinton específiques per a la determinació de la susceptibilitat antimicrobiana.

Els cultius de BAL seleccionats se sembren en la superfície de plaques de Petri amb agar Mueller Hinton. Amb l'objectiu d'obtenir cultius confluents, es realitza una suspensió de terbolesa 0,5 en l'escala de McFarland[®] de cada microorganisme en Ringer Lactat, la qual equival a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. La suspensió es reparteix mitjançant l'ús d'un hisop estèril en la totalitat de la superfície de la placa de Mueller Hinton, per hisopat en dues o tres direccions per assegurar una completa i homogènia distribució de l'inòcul.

Acte seguit, es dipositen els discs d'antibiòtic sobre les plaques inoculades i s'incuben durant 18 hores en les condicions idònies de temperatura i respiració de cada soca. Transcorregut aquest temps obtenim cultius confluents en les plaques. Els resultats de les interaccions cultiu-antibiòtic s'observen com a formacions de zones d'inhibició: zones transparents, indicadores d'absència de creixement, presents al voltant dels discs d'antibiòtic. Les zones d'inhibició es poden presentar com a uniformement circulars o no uniformes, amb presència d'una o diverses zones concèntriques de creixement. Es mesuren tres diàmetres d'inhibició amb l'ajuda d'un peu de rei (Imatge 21) i es fa una mitjana del valor. En el cas que l'halo d'inhibició presenti creixement o colònies en el seu interior, només es tindran en compte si són grans, no incloent aquelles que siguin molt petites i que es detectin visualment només amb molta dificultat. Les colònies més grans s'hauran de reidentificar i reassajar.



Imatge 21. Mesura d'un halo d'inhibició amb peu de rei.

Els diàmetres obtinguts es comparen amb les taules proporcionades per la empresa que proporciona els discs d'antibiòtics. La lectura dels halos permet la classificació dels microorganismes en sensibles, intermedis o resistents enfront a els antibiòtics assajats.

4.3.1.3.2. Segon *screening*: Avaluació de la concentració mínima inhibidora (MIC) en brou de cultiu.

Aquelles soques que no superen el primer *screening* i les que obtenen valors de sensibilitat intermedis es tornen a avaluar usant el mètode quantitatiu per a la determinació de la MIC en cultiu líquid. El valor MIC es defineix com la concentració més baixa d'antibiòtic capaç d'inhibir el creixement bacterià.

El test es realitza en tubs d'assaig amb medi MRS als quals se'ls addiciona la concentració d'antibiòtic necessària (Taula 18) i s'esterilitzen mitjançant un filtre. Els tubs s'incuben en les condicions idònies de temperatura i respiració de cada soca durant 18 hores, juntament amb un control sense antibiòtic de cada soca. Transcorregut aquest temps s'observen els tubs a contrallum: la presència de turbolesa al medi indica un creixement positiu i per tant una manca d'inhibició. Una absència de turbolesa no és suficient per confirmar l'absència de creixement, cal sembrar una alíquota en placa MRS i obtenir absència de creixement a les 18-24 hores. Un creixement al tub amb antibiòtic i/o a la placa indica que la soca és resistent.

4.3.1.3.3. Tercer *screening*: Avaluació de la concentració mínima inhibidora (MIC) en placa de cultiu.

Aquelles soques que no superen el segon *screening* s'avaluen pel mètode en placa d'agar. En aquest cas, s'inoculen diferents concentracions de la soca per inclusió en una placa amb agar MRS líquid amb antibiòtic i es deixa solidificar.

- Preparació de l'antibiòtic: Els antibiòtics es preparen en una suspensió 10 vegades concentrada en brou MRS i s'esterilitzen amb filtre.
- Preparació de la soca: Es preparen alíquotes a 10^5 , 10^6 i 10^7 UFC/mL aproximadament, valorant les suspensions amb l'ajuda d'una càmera de Neubauer.
- Preparació de la placa: En una placa estèril s'addicionen 18 mL d'agar MRS, 2 mL de la suspensió d'antibiòtic i 200 μ L de la suspensió amb el microorganisme. Es realitza una placa per cada concentració de cada soca, així com un control negatiu

substituint la suspensió amb l'antibiòtic per 2 mL de brou MRS. S'homogeneïtza el contingut de la placa i es deixa assecar. S'incuba durant 24 hores a les condicions idònies per a cada soca.

- Lectura: A les 24 hores es valoren els creixements dels controls positius. A les plaques amb antibiòtic el creixement ha de ser negatiu. En cas que sigui positiu, es considera la soca resistent al antibiòtic.

4.3.2. Determinació de la producció de toxines i capacitat hemolítica

La capacitat hemolítica és un paràmetre essencial per tal d'avaluar la possible patogenicitat de les soques. Per posar-la de manifest, es procedeix a la sembra per esgotament dels cultius potencialment probiòtics en el medi Columbia Agar Sang (per a més informació vegeu l'apartat 2.3.2. d'aquesta secció).

4.4. Avaluació de la resistència a les condicions gastrointestinals

4.4.1. Fonament

Un paràmetre important a l'hora de seleccionar soques probiòtiques és la seva capacitat per arribar a l'intestí conservant la seva viabilitat. Per tal d'avaluar la capacitat de les soques de BAL de resistir a través del seu pas pel tracte gastrointestinal, es realitzen una sèrie d'assajos *in vitro* que permeten quantificar aquesta supervivència: tractament amb lizozim, sals biliars, peròxid d'hidrogen i pH àcid (Dunne *et al.*, 2001).

4.4.2. Material necessari

- Soques a assajar
- Brou MRS (MRS Broth ISO 15214, Ref: 610025, Liofilchem srl, Itàlia).

- Microplaques ELISA de 96 pouets Microtiter (Deltalab, SL)
- Lisozim (Ref: L6876-1G Sigma-Aldrich Co., USA).
- Àcid clorhídric al 37% (Ref: 131020.1611, Panreac Química S.A., Espanya).
- Hidròxid de sodi (Ref: S00420, Scharlab, SA, Espanya).
- Perdrogen[®] 30% H₂O₂ (p/p) (Ref: 31642-500ML, SIGMA[®], Sigma-Aldrich Co., USA).
- Sals biliars (Ref: B8756-10G, SIGMA[®], Sigma-Aldrich Co., USA).
- Lector ELISA (Labsystems Multiscan RC, Thermo, Finlàndia).
- Estufa de 37°C i 42°C.
- pHímetre (Mod: HI 2211, HANNA instruments, Espanya).
- Micropipeta 2 -20 µL, Ref: 105301, Nichipet EX, Japó).
- Micropipeta multicanal 50 – 300 µL, Thermo Labsystems, USA).
- Micropipeta 20 µL -200 µL (Ref: F123601, Gilson S.A.S., França).
- Balança de precisió 0,001 g – 200 g

4.4.3. Metodologia

Les soques seleccionades per l'assaig s'incuben en MRS líquid durant 18 hores en les condicions idònies per la soca tant de temperatura com de respiració.

Els reactius necessaris es preparen amb la quantitat necessària per a realitzar l'assaig per triplicat. Les concentracions finals que s'han d'assolir en cada pouet de la microplaca es detallen a la Taula 19. Les dilucions es realitzen sobre brou MRS.

Reactius per a l'assaig de resistència a les condicions gastrointestinals				
Rangs de concentració assajats	Lisozim	Sals biliars	Peròxid d'hidrogen	pH àcid (ajustat amb HCl 1M)
	100 µg/mL	0,3% p/v	30 µg/mL	1,5 a 6,5 (en intervals de 0,5)
	200 µg/mL	0,5% p/v	20 µg/mL	
	300 µg/mL	1% p/v	10 µg/mL	
Condicions d'incubació	37°C, 60 min	37°C, 180 min	37°C, 30 min	42°C, 120 min

Taula 19. Concentració dels reactius i condicions d'incubació per a l'avaluació de la resistència de les soques làctiques a condicions gastrointestinals.

Per a inocular les plaques ELISA, es dipositen a la microplaca 200 µL de cada reactiu i posteriorment s'afegeixen 20 µL del cultiu de cada soca. En tots els casos es realitza un control positiu per a cada soca (amb brou MRS sense reactius), i un control negatiu per a cadascuna de les concentracions dels diversos reactius (substituint els 20 µL de cultiu de soca per brou estèril MRS). Finalment, s'afegeix un control de medi de cultiu que contingui únicament 220 µL de brou MRS. Les microplaques s'incuben a les condicions mencionades a la Taula 19. Una vegada transcorregut el temps necessari, es processen pel lector ELISA, realitzant les lectures a una longitud d'ona de 620 nm.

La interpretació dels resultats es realitza segons els següents criteris:

- Tolerància al liozozim: S'expressa com la menor concentració capaç d'inhibir completament el desenvolupament de la soca.
- Tolerància al medi àcid: S'expressa com el menor pH en el qual la densitat òptica detectada és, com a mínim, el 40% de la detectada a pH 6,5.
- Tolerància a sals biliars: Permet comparar la resistència a aquest paràmetre entre les diverses soques.
- Tolerància al peròxid d'hidrogen: S'expressa com la menor concentració capaç d'inhibir completament el desenvolupament de la soca.

5. Detecció de la producció de substàncies antimicrobianes

Per valorar la producció de substàncies antimicrobianes per part de les soques seleccionades com a potencialment probiòtiques es va utilitzar una modificació de la metodologia descrita per la *International Organization for Standardization* (Campbell, 1960), un mètode de difusió en agar per determinar els efectes antimicrobians de diferents compostos, també anomenat mètode del sobrenedant en pouets (Kun, 2008; Amorocho, 2011).

Paral·lelament, es va valorar la producció de peròxid d'hidrogen avaluant el creixement de les soques làctiques seleccionades en agar MRS amb peroxidasa i un cromogen.

5.1. Mètode de difusió en agar

5.1.1. Fonament

Es tracta d'una tècnica fenotípica de difusió per a l'estudi de la capacitat per part de certes soques de bacteris de produir substàncies antimicrobianes durant el seu desenvolupament en condicions determinades. Amb aquesta finalitat, els bacteris dels quals es vol conèixer la capacitat antimicrobiana es posen en contacte amb altres microorganismes dels quals es desitja inhibir el creixement. Aquesta interacció es fa en una placa d'agar que permet la difusió de les substàncies inhibidores. Aquest mètode també permet estudiar la capacitat antimicrobiana dels metabòlits creats per part

d'aquests bacteris, ja que són alliberats al medi si aquests es fan créixer en un cultiu líquid, permetent la seva recuperació.

5.1.2. Soques i compostos en estudi

Per realitzar aquest assaig es van seleccionar 11 soques de bacteris àcid làctics (BALs) obtinguts de llet d'euga o de femtes de poltre i euga. Paral·lelament, es van escollir 12 soques de microorganismes de diferents gèneres amb diverses implicacions en processos patològics (Taula 20).

Soques BALs	Origen	Microorganismes a	
		inhibir	Origen
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	Llet euga	<i>Escherichia coli</i>	CECT 434
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	Llet euga	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Matriu alimentària
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	Llet euga	<i>Salmonella enterica</i>	Matriu alimentària
<i>Lactobacillus plantarum</i> 4	Llet euga	<i>Proteus vulgaris</i>	Matriu alimentària
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5	Llet euga	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Matriu alimentària
<i>Lactobacillus plantarum</i> 6	Llet euga	<i>Pantoea</i> sp.	Llet euga
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	Femta euga	<i>Enterococcus faecalis</i>	Matriu alimentària
<i>Lactobacillus brevis</i> 2	Femta poltre	<i>Listeria monocytogenes</i>	CECT 935
<i>Lactococcus lactis</i>	Llet euga	<i>Staphylococcus aureus</i>	Matriu alimentària
<i>Enterococcus durans</i>	Llet euga	<i>Bacillus cereus</i>	Matriu alimentària
<i>Enterococcus faecium</i>	Llet euga	<i>Bacillus subtilis</i>	Matriu alimentària
		<i>Kocuria rhizophila</i>	Matriu alimentària

Taula 20. Resum dels bacteris àcid làctics (BALs) i dels bacteris implicats en processos patològics emprats en aquest estudi.

5.1.3. Material necessari

- Escala de McFarland Standard® (Ref. 70 900, bioMérieux SA, França).
- Hisop estèril (Ref: 310200, Deltalab S.L., Espanya).
- Ringer Lactat (Ringer Powder, Ref: 06-073, Sharlab S.L., Barcelona, Espanya).
- Agar de cultiu TSA (Tryptone Soy Agar, Ref: 610.052, Liofilchem srl, Itàlia).
- Agar Man Rogosa Sharpe (MRS agar ISO 15214, Ref: 610.024, Liofilchem srl, Itàlia).
- Brou Man Rogosa Sharpe (MRS Broth ISO 15214, Ref: 610025, Liofilchem srl, Itàlia).
- pHímetre (Mod: HI 2211, HANNA instruments, Espanya).
- Hidròxid de sodi (Ref: S00420, Scharlab, SA, Espanya).
- Trepador estèril.
- Compostos amb potencial activitat antimicrobiana en solució aquosa.
- Centrífuga (Digtor 21, RT192 Ortoarlesa, Espanya).

5.1.4. Metodologia

5.1.4.1. Preparació de les soques i compostos

Per tal d'obtenir cultius líquids dels BALs, se sembra una colònia de cada soca procedent d'agar de cultiu MRS en un tub de 9 mL de brou de cultiu MRS. Transcorregudes 24 hores d'incubació a 37°C en aerobiosi, es procedeix a centrifugar els tres tubs a 2500 rpm durant 10 minuts. Els diferents pellets obtinguts se separen de les fases aquoses, ja que ambdós poden ser objecte d'estudi. El pH de les fases aquoses es determina amb l'ajuda d'un pHímetre.

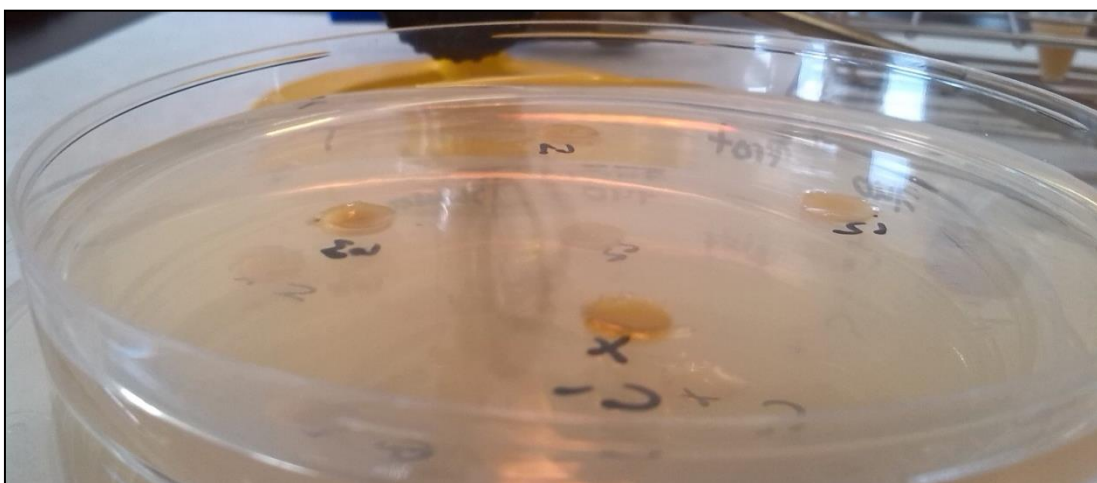
Amb la finalitat de descriure la naturalesa dels compostos antimicrobians que es poguessin generar, se separen diverses alíquotes dels diversos sobrenadants. Una alíquota de cada soca se sotmet a neutralització del pH mitjançant l'addició de NaOH 1M. Una altra alíquota se sotmet a xoc tèrmic a 80°C durant 10 minuts. Els pellets es suspenen en 1 mL de medi MRS Broth, obtenint així concentrats líquids de les soques làctiques, facilitant la seva posterior inoculació. La densitat dels concentrats acostuma a

ser entre 10^{10} i 10^{12} UFC/mL depenent de la soca, fet que es corrobora mitjançant la sembra i recompte en placa de MRS.

5.1.4.2. Realització de l'assaig de difusió

En aquest assaig, els microorganismes dels quals es desitja inhibir el desenvolupament o soques problema se sembren per separat en la superfície de plaques de Petri amb medi de cultiu nutritiu Triptona Soja Agar. Amb l'objectiu d'obtenir cultius confluents, es realitza una suspensió microbiana de cada microorganisme en Ringer Lactat de terbolesa 0,5 en l'escala de McFarland[®], equivalent a $1,5 \times 10^8$ unitats formadores de colònia per mil·lilitre (UFC/mL). La suspensió es reparteix mitjançant l'ús d'un hisop estèril en la totalitat de la superfície de la placa de TSA, per hisopat en dues o tres direccions per assegurar una completa i homogènia distribució de l'indòcul.

Els compostos dels quals es desitja conèixer l'activitat antimicrobiana, en aquest cas les soques de BALs i els seus metabòlits, es col·loquen posteriorment de forma local en l'agar (Imatge 22), on prèviament es crea un pouet de 6mm de diàmetre mitjançant l'ús d'un trepador, creant un orifici rodó de diàmetre conegut del qual s'extreu l'agar. Es valora la quantitat d'indòcul i la seva densitat mitjançant la sembra d'una alíquota en placa de MRS. Cal incloure en cada assaig un control negatiu de brou MRS estèril.



Imatge 22. Placa de TSA amb un assaig de difusió en agar. S'observen quatre pouets a l'agar, omplerts amb diferents suspensions.

Les plaques s'incuben en les condicions idònies de creixement de les soques problema, és a dir, aquelles que es desitja inhibir (37°C en aerofília per a totes les soques excepte *Enterococcus faecalis*, que s'incuba a 42°C).

Transcorregudes 24 hores d'incubació, s'observen les plaques a simple vista. Els resultats de les interaccions s'observen com a formacions de zones d'inhibició; zones transparents, indicadores d'absència de creixement, presents al voltant dels pouets on es van dipositar soques làctiques o els seus metabòlits. Les zones d'inhibició han de ser uniformement circulars i el desenvolupament bacterià confluent o gairebé confluent, i la seva grandària és indicativa de l'eficàcia de la soca inoculada al pouet per aturar el creixement dels microorganismes problema. Les zones d'inhibició es mesuren amb l'ajuda d'un peu de rei.

Els resultats s'expressen com un valor d'inhibició (VI), calculat utilitzant la següent fórmula (modificació de Campbell, 1960):

$$VI = \frac{\text{Diàmetre de la zona d'inhibició} - \text{Diàmetre del pouet}}{2}$$

5.2. Avaluació de la formació de peròxid d'hidrogen

5.2.1. Fonament

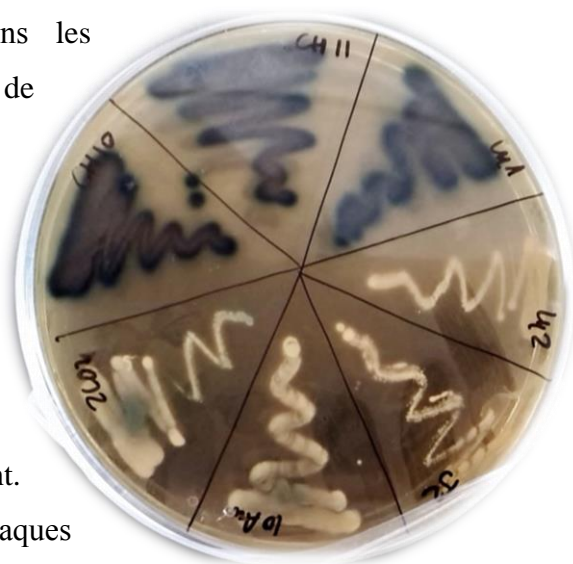
Diversos mètodes han estat utilitzats per detectar la producció de peròxid d'hidrogen (H₂O₂) per part dels bacteris àcid làctics. Els assajos es basen generalment en l'oxidació d'un cromogen que funciona com un donador d'hidrogen per un complex peroxidasa-H₂O₂, el que resulta en un canvi de color o fluorescència en funció del cromogen utilitzat.

5.2.2. Material necessari

- MRS agar (ISO 15214, Ref: 610024, Liofilchem s.r.l., Itàlia).
- Peroxidasa de rave (Ref: P8250-50KU, SIGMA®, Sigma-Aldrich Co., USA).
- 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina o TMB (Ref: 1.08622.0001, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya).
- Metanol (Ref: ME0302, Scharlab SA, Espanya).
- Cultius axènics dels microorganismes dels quals es desitja conèixer l'activitat peroxidasa.

5.2.3. Metodologia

L'agar MRS es prepara i s'esterilitza segons les instruccions de la casa comercial. En el moment de la seva distribució en les plaques de Petri estèrils, s'addiciona el cromogen TMB (250 mg/L) i la peroxidasa de rave picant (1g/L) (Piard, i Desmazeaud, 1991). Quan l'agar es solidifica, es sembra el microorganisme que es vol assajar per esgotament i s'incuba durant 24 hores en les condicions idònies per al seu desenvolupament. Una vegada s'ha obtingut el creixement, les plaques



s'exposen a l'aire durant un curt període de temps. La formació de color al voltant de les colònies indica la producció de H_2O_2 (Imatge 23).

Imatge 23. Placa de MRS agar + TMB + peroxidasa. Els microorganismes positius per a la producció de peròxid d'hidrogen presenten un creixement de color verd degut a l'oxidació del cromogen.

6. Avaluació de la llet d'euga com a crioprotector

6.1. Descripció del mètode

6.1.1. Fonament

La liofilització i posterior emmagatzematge de les soques bacterianes està acompanyada per una disminució de la viabilitat cel·lular degut a que l'assecat exposa les cèl·lules a un tractament estressant. Per tal de minimitzar aquest dany, és habitual l'ús de substàncies crioprotectors. La llet de vaca està reconeguda com a crioprotector i s'utilitza per a la preparació de cultius liofilitzats.

6.1.2. Cultius bacterians seleccionats

Els microorganismes escollits per a realitzar l'estudi es detallen a la Taula 21.

Nom de la soca BAL	Procedència
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	Llet d'euga
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	Llet d'euga
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	Femta d'euga
<i>Lactococcus lactis</i>	Llet d'euga

Taula 21. Resum dels microorganismes emprats per l'estudi de crioconservació, així com la seva procedència.

Els cultius purs es van recuperar de criovials Cryoinstant[®] (Ref:409113/6, Deltalab S.L., Espanya) (vegeu apartat 2.4.1. d'aquesta secció), regenerant-se en medi de cultiu Man Rogosa Sharpe (MRS Agar ISO 15214, Ref: 610024, Liofilchem s.r.l., Itàlia).

6.1.3. Medi de suspensió i rang de concentracions

El crioprotector que es va avaluar en aquest estudi va ser la llet en pols d'euga Bio Activ (Equillet, Olot, Girona), la qual es va comprar amb la llet desnatada de vaca comercial.

El rang de concentracions usat en aquest estudi cobreix les concentracions comunament aplicades i inclouen valors que han estat prèviament utilitzats en altres estudis (Huang *et al.*, 2006; Khoramnia, 2011; Girmé *et al.*, 2014) (Taula 22).

Concentracions de matèria seca						
Llet d'euga	0%	5%	10%	15%	20%	25%
Llet de vaca	0%	5%	10%	15%	20%	25%

Taula 22. Concentracions de llet en pols emprades en l'estudi.

6.1.4. Material necessari

- Llets en pols i cultius axènics de bacteris a assajar.
- Brou MRS (MRS Broth ISO 15214, Ref: 610025, Liofilchem srl, Itàlia).
- Plaques de Petri amb agar MRS (MRS agar ISO 15214, Ref: 610.024, Liofilchem srl, Itàlia).
- Ringer Powder (Ref: 06-073, Sharlab S.L., Barcelona, Espanya).
- Tubs de fons cònic estèrils de 15 mL (Ref: 31402231, Deltalab S.L., Espanya).
- Tubs de microcentrífuga (Ref: 175508, Daslab®, Espanya).
- Solució fosfat tamponada PBS (*Phosphate Buffered Saline*, pH 7.2, Ref: A9202,0010, AppliChem, Darmstadt, Alemanya).

- Centrífuga (Digtor 21, RT192, Ortoarlesa, España).
- Liofilitzador (Alpha 1-2 LD, Ref: 101021, Fisher Scientific S.L., Espanya).
- Vials de 4 mL de capacitat transparents (Ref: 212FIB16040, Sudelab, Espanya).
- Taps de goma de butil (Ref: 212CC916, Sudelab, Espanya).

6.1.5. Metodologia

Una colònia obtinguda de cadascun dels cultius en agar MRS se suspèn en 100 mL de brou MRS i s'incuba a 37°C en una atmosfera amb un 5% de CO₂ durant 18 hores, moment en el qual els cultius es troben a prop de la seva fase estacionària de creixement, obtenint una concentració inicial d'aproximadament 10⁹ unitats formadores de colònies (UFC)/ mL.

Aquest fet es comprova mitjançant la sembra de 100 µL del cultiu líquid en la superfície de plaques d'agar MRS una vegada efectuat un banc de dilucions en solució Ringer Lactat en tubs de microcentrífuga de 1.5 mL de capacitat, i incubant les plaques 24 hores (37°C, 5% CO₂).



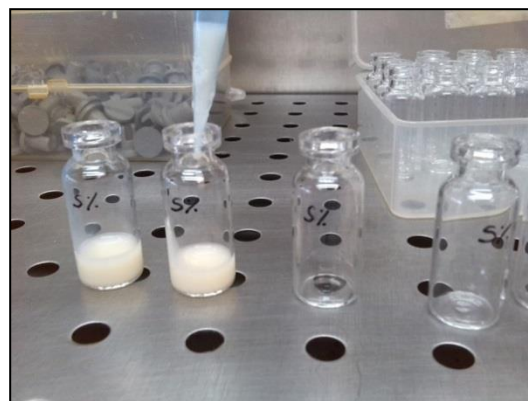
Imatge 24. Pellets separats de la porció líquida per centrifugació

El cultiu obtingut es reparteix en 8 tubs de fons cònic estèrils amb l'ajuda d'una pipeta graduada, a raó de 10 mL per tub. Se separa els pellets de les porcions líquides per centrifugació a 2500 rpm durant 10 minuts (Imatge 24). Els pellets es renten dues vegades en el mateix volum de solució fosfat tamponada o PBS per centrifugació. Posteriorment, els pellets se suspèn en 2 mL de les diferents combinacions de crioprotector anteriorment mencionades (Imatge 25). Els controls es preparen substituint el crioprotector per PBS. Un mil·lilitre de cada combinació es trasllada a un vial de vidre (Imatge 26) el qual es tanca parcialment amb un tap de goma especial per a vials de forma que permeti una correcta sortida dels productes gasosos de la sublimació.

Tot seguit es procedeix a preparar les combinacions obtingudes per a ser sotmeses a la liofilització. Es col·loquen els vials en el suport del liofilitzador i es congelen mantenint-los a -20°C durant 4 hores. Transcorregut aquest temps, s'introdueix el suport dins del liofilitzador, assegurant la correcta formació del buit dins d'aquest, així com l'assoliment i manteniment de la temperatura.



Imatge 25. Tubs de centrífuga amb una de les soques en estudi abans de centrifugar (tubs del fons) i després de centrifugar i suspendre en llet d'euga (primera fila).



Imatge 26. Ompliment dels vials de vidre amb les suspensions de lactobacils en llet d'euga.

La liofilització duu a terme a una temperatura del col·lector de -55°C , a 0,06 mbar de pressió. Un cop completat el cicle de liofilització, es tanquen els vials dins el liofilitzador per tal que el contingut quedi segellat al buit, evitant la contaminació per l'aire extern (Imatge 27). Seguidament es retiren els vials del liofilitzador i del suport, es comprova que l'estat d'assecament dels vials sigui el correcte, i es procedeix a la seva encapsulació (Imatge 28). Els liòfils es mantenen en refrigeració a 4°C , evitant l'exposició directa a la llum.



Imatge 27. Vials post liofilització, segellats al buit.

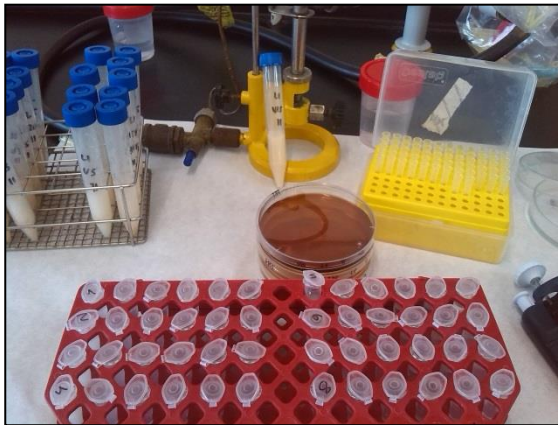


Imatge 28. Vials liofilitzats i encapsulats.

6.2. Determinació de la viabilitat dels microorganismes

6.2.1. Determinació de la viabilitat pre-liofilització

Una vegada suspesos en els medis amb crioprotectors i abans de liofilitzar-los, una alíquota de cada combinació s'utilitza per a determinar les diferents viabilitats pre-liofilització, les quals permeten el càlcul posterior de la pèrdua de viabilitat. Es realitza un banc de dilucions en Ringer Lactat amb l'ajuda de tubs de microcentrífuga (Imatge 29). 100 μ L de les dilucions adequades se sembren en plaques d'agar MRS mitjançant la sembra en superfície (Imatge 30), i es deixen incubar a 37°C en atmosfera amb 5% de CO₂ durant 24 hores, per al seu posterior recompte.



Imatge 29. Realització dels diferents bancs de dilucions i sembra en placa de MRS agar.



Imatge 30. Detall de la sembra per superfície amb nansa de Digrafsky

6.2.2. Determinació de la viabilitat post-liofilització

Després de la liofilització, el producte d'un dels vials de cada concentració de crioprotector es rehidrata amb 1 mL de brou MRS. La determinació de la viabilitat de les cèl·lules després de la liofilització es duu a terme usant el mateix procediment que per al cas de la determinació pre-liofilització (vegeu 6.2.1. d'aquesta secció).

6.2.3. Determinació de la conservació de la viabilitat al llarg del temps

Un vial de cada tipus es regenera amb 1 mL de brou MRS a les 24 i a les 48 hores, així com als 7, 15, 30 i 90 dies post liofilització. La determinació de la viabilitat cel·lular al llarg del temps es duu a terme usant el mateix procediment que per al cas de la determinació pre-liofilització (vegeu 6.2.1. d'aquesta secció).

Els detalls de les condicions en les quals es varen conservar els vials es detallen a la Taula 23. Es pot veure com una de les soques es va mantenir a temperatura ambient per tal d'avaluar el possible impacte de la temperatura en la correcta conservació de les soques.

Nom de la soca	T ^a conservació	Oxigen	Llum	Pressió
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	20-25°C	Absència	Absència	0,06 mbar
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	4°C	Absència	Absència	0,06 mbar
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	4°C	Absència	Absència	0,06 mbar
<i>Lactococcus lactis</i>	4°C	Absència	Absència	0,06 mbar

Taula 23. Condicions d'emmagatzematge dels vials liofilitzats destinats a la determinació de la viabilitat a llarg termini.

RESULTATS



1. Caracterització microbiològica de la llet d'euga al llarg de la gestació

1.1. Recomptes microbiològics totals de les llets de dues eugues al llarg de la gestació

A continuació es mostren els resultats de les sèries de les llets crues obtingudes de les dues eugues gestants: Euga 1 (Jade) i Euga 2 (Jaine). Les taules i figures que es mostren fan referència als medis de cultiu en els quals es va presentar creixement. Els medis de cultiu que no van mostrar creixement al llarg de l'assaig han estat omesos i es discutiran posteriorment.

1.1.1. Recomptes microbiològics d'Euga 1 (Jade)

L'Euga 1 presenta uns recomptes microbiològics compresos en un rang que va des de l'absència de creixement de colònies a la placa (<10 UFC/mL) fins a valors de $2,3 \times 10^4$ UFC/mL (Taula 24). En cap cas els recomptes van superar el límit de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL establert pel Reglament (CE) N° 853/2004.

Recomptes microbiològics Euga 1 (UFC/mL)										
Data	Mes									
extracció	gestació	COS37	TSA37	TSAAn	MC37	MRS37	MRS5%	MRSAn	MRSB37	MRSB5%
1/01/2013	8	170	30	40	<10	<10	<10	<10	A	A
4/02/2013	9	370	10	10	<10	<10	<10	<10	A	A
7/03/2013	10	1760	1210	700	<10	70	80	120	P	P
2/04/2013	11 ^(a)	4080	4200	80	<10	110	90	10	P	P
30/06/2014	1	3500	2500	600	4000	3300	300	1400	P	P
22/09/2014	3	7000	6920	20	3880	<10	<10	<10	A	A
21/10/2014	4	910	200	10	<10	<10	<10	20	A	A
19/12/2014	6	625	875	1425	<10	<10	5	<10	A	A
13/01/2015	7	5485	3240	210	<10	<10	<10	15	A	P
14/02/2015	8 ^(b)	23300	21680	<10	430	<10	<10	<10	A	A

Taula 24. Recomptes microbiològics de la llet d'Euga 1 a les 48 hores d'incubació. Resultats expressats en unitats formadores de colònia per mL. Les mostres es van obtenir en dues gestacions no consecutives. COS37= Columbia Sheep blood Agar, 37°C. TSA37= Tryptone Soy Agar, 37°C. TSA An= Tryptone Soy Agar, 37°C en anaerobiosi. MC37= MacConkey Agar, 37°C. MRS37=Man Rogosa Sharpe Agar, 37°C. MRS5%= Man Rogosa Sharpe Agar, 37°C + 5%CO₂. MRSAn= Man Rogosa Sharpe, 37°C en anaerobiosi. MRSB37= Man Rogosa Sharpe Broth, 37°C. MRSB5%= Man Rogosa Sharpe Broth, 37°C + 5% CO₂. (a) Euga avortada. (b) Euga en deslletament. P= Presència de creixement. A= Absència de creixement.

1.1.2. Recomptes microbiològics d'Euga 2 (Jaine)

L'Euga 2 presenta uns recomptes microbiològics compresos en un rang que va des de l'absència de creixement de colònies a la placa (<10 UFC/mL) fins a valors de $5,2 \times 10^3$ UFC/mL (Taula 25). En cap cas els recomptes van superar el límit de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL establert pel Reglament (CE) N° 853/2004.

Recomptes microbiològics Euga 2 (UFC/mL)										
Data	Mes									
extracció	gestació	COS37	TSA37	TSAAn	MC37	MRS37	MRS5%	MRSAn	MRSB37	MRSB5%
1/01/2013	8	50	10	10	<10	<10	10	<10	A	P
4/02/2013	9	1400	170	30	<10	<10	<10	<10	A	A
7/03/2013	10	2440	1440	4240	<10	40	30	60	P	P
2/04/2013	11 ^(a)	3400	1110	40	<10	<10	<10	<10	A	A
30/06/2014	1	2300	1500	500	<10	4600	250	1000	P	P
22/09/2014	3	5200	1500	<10	3200	<10	<10	80	A	A
21/10/2014	4	5120	360	20	<10	<10	<10	20	A	A
19/12/2014	6	350	205	630	<10	<10	<10	5	A	A
13/01/2015	7	6410	7840	690	30	295	605	425	A	P
14/02/2015	8 ^(b)	31000	26720	<10	525	<10	<10	<10	A	P

Taula 25. Recomptes microbiològics de la llet d'Euga 2 a les 48 hores d'incubació. Resultats expressats en unitats formadores de colònia per mL. Les mostres es van obtenir en dues gestacions no consecutives. COS37= Columbia Sheep blood Agar, 37°C. TSA37= Tryptone Soy Agar, 37°C. TSA An= Tryptone Soy Agar, 37°C en anaerobiosi. MC37= MacConkey Agar, 37°C. MRS37=Man Rogosa Sharpe Agar, 37°C. MRS5%= Man Rogosa Sharpe Agar, 37°C + 5%CO₂. MRSAn= Man Rogosa Sharpe, 37°C en anaerobiosi. MRSB37= Man Rogosa Sharpe Broth, 37°C. MRSB5%= Man Rogosa Sharpe Broth, 37°C + 5% CO₂. (a) Euga avortada. (b) Euga en deslletament. P= Presència de creixement. A= Absència de creixement.

1.1.3. Figures dels recomptes microbiològics de la llet d'Euga 1 i d'Euga 2

Les Figures 12, 13 i 14 mostren els principals recomptes de les Taules 24 i 25. Aquestes figures ens permeten interpretar l'evolució dels recomptes microbiològics. Per a millorar la seva visualització, els resultats han estat transformats a escala logarítmica.

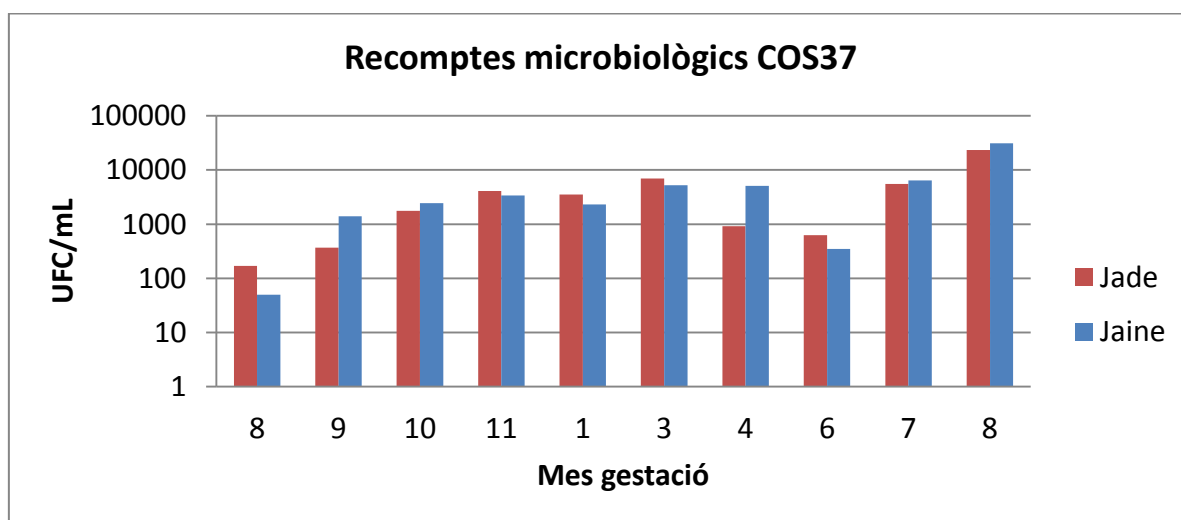


Figura 12. Recomptes microbiològics de la llet d'Euga 1 (Jade) i Euga 2 (Jaine) a les 48 hores d'incubació en el medi Columbia Sheep blood Agar (COS) a 37°C. UFC/mL= unitats formadores de colònia /mL.

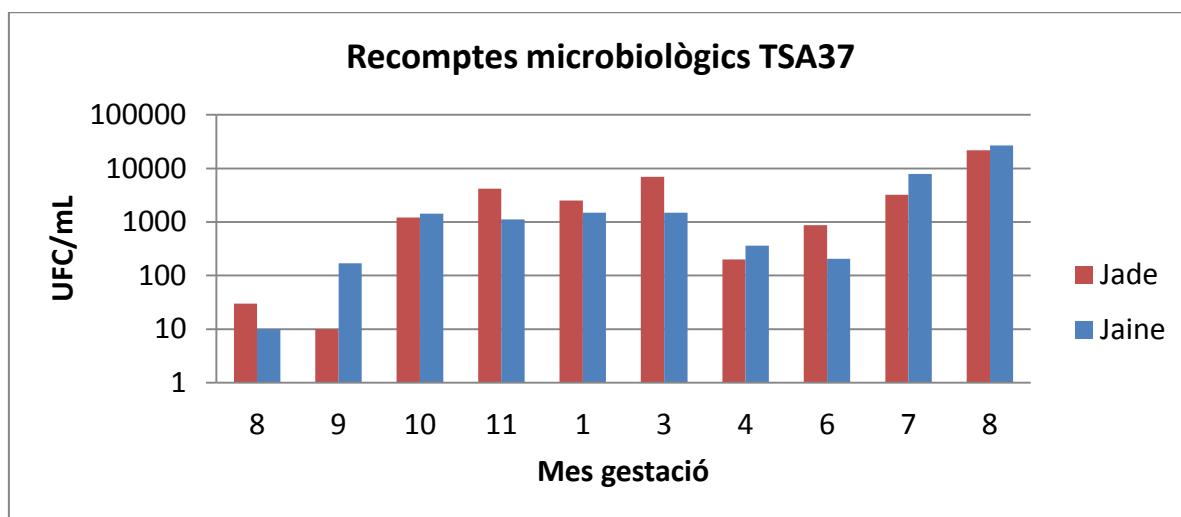


Figura 13. Recomptes microbiològics de la llet d'Euga 1 (Jade) i de l'Euga 2 (Jaine) a les 48 hores d'incubació en el medi Tryptone Soy Agar (TSA) a 37°C. UFC/mL= unitats formadores de colònia/mL.

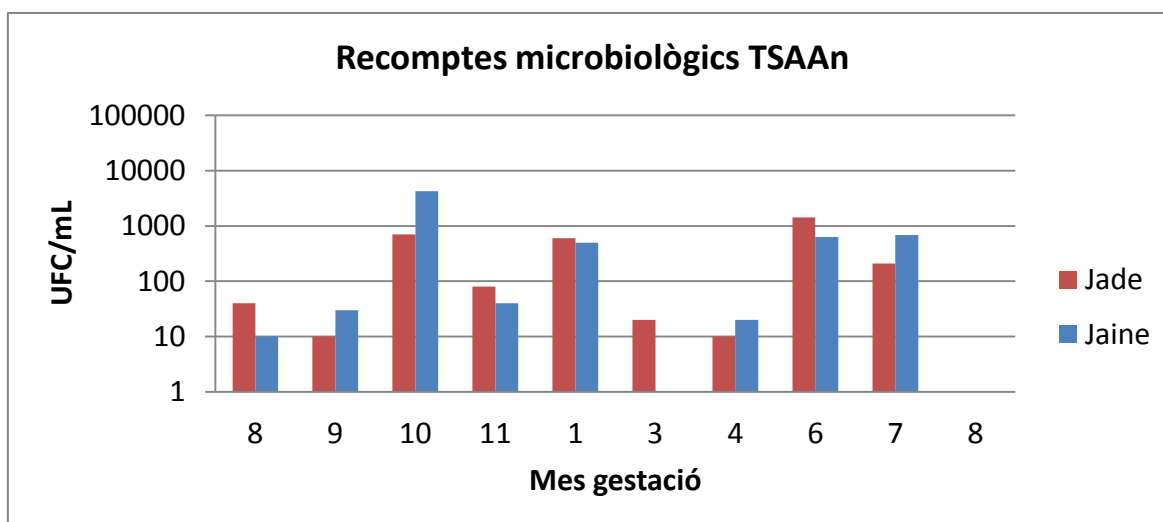


Figura 14. Recounts microbiològics de la llet d'Euga 1 (Jade) i de l'Euga 2 (Jaine) a les 48 hores d'incubació en el medi Triptone Soy Agar (TSA) a 37°C en condicions d'anaerobiosi. UFC/ mL= unitats formadores de colònia /mL.

1.1.4. Anàlisi estadístic dels recomptes microbiològics

Per tal de conèixer la relació entre les dades obtingudes dels recomptes microbiològics de les dues eugues, es realitza un anàlisi estadístic (test d'hipòtesi) mitjançant una prova t de Student (T Test) per a dues mostres relacionades entre si (mitjana de dues mostres emparellades). Es va escollir un nivell de significació $\alpha=0,05$.

La taula 26 mostra el nivell de significació observat (p valor) obtingut de la comparació dels recomptes microbiològics de les llets de les dues eugues. En primer lloc s'ha realitzat l'anàlisi en valors absoluts, i finalment els valors s'han transformat a escala logarítmica per tal de disminuir la variància existent entre els grups i dins els mateixos.

		COS37	TSA37	TSAAn
P valor	Valor absolut	0,27	0,99	0,43
	Log	0,69	0,78	0,78
Variància	Valor absolut	83072023,3	68501913,6	1701004,4
	Log	0,58	0,90	1,52
CC Pearson (r)	Valor absolut	0,97	0,93	0,43
	Log	0,86	0,83	0,86

Taula 26. Resum dels principals valors estadístics obtinguts de l'aplicació de la prova t-Student considerant els recomptes microbiològics de les llets de Euga 1 i Euga 2 com a variables emparellades.

1.2. Recomptes microbiològics totals de la llet d'Euga 1 en període no gestant

Els recomptes microbiològics de la llet de l'Euga 1 (Jade) en el període no gestant es resumeixen en la Taula 27.

Data									
extracció	COS37	TSA37	TSAAn	MC37	MRS37	MRS5%	MRSAn	MRSB37	MRSB5%
5/05/2014	1230	1130	500	<10	<10	40	20	A	P

Taula 27. Recomptes microbiològics de la llet d'Euga 1 a les 48 hores d'incubació. Resultats expressats en unitats formadores de colònia per mL. Les mostres es van obtenir en el període no gestant. COS37= Columbia Sheep blood Agar, 37°C. TSA37= Triptone Soy Agar, 37°C. TSA An= Triptone Soy Agar, 37°C en anaerobiosi. MC37= MacConkey Agar, 37°C. MRS37=Man Rogosa Sharpe Agar, 37°C. MRS5%= Man Rogosa Sharpe Agar, 37°C + 5%CO₂. MRSAn= Man Rogosa Sharpe, 37°C en anaerobiosi. MRSB37= Man Rogosa Sharpe Broth, 37°C. MRSB5%= Man Rogosa Sharpe Broth, 37°C + 5% CO₂. P= Presència de creixement. A= Absència de creixement.

1.3. Resultats dels aïllaments i caracteritzacions de les colònies obtingudes

Els principals gèneres microbiològics aïllats en els diferents medis de cultiu es resumeixen en la Taula 28 (Euga 1) i la Taula 29 (Euga 2). També es detalla la presència de la família Enterobacteriaceae, així com la d'enterobacteris lactosa positius (coliformes).

Euga 1 (Jade)		<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	Enterobacteriaceae	Coliformes	<i>Saccharomyces</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Kocuria</i> spp.	<i>Hyphomicrobium</i> spp	<i>Cellulomonas</i> spp.	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Burkholderia</i> sp.
1/01/2013	8 m													
4/02/2013	9 m													
7/03/2013	10 m													
2/04/2013	11 m													
	0 m													
30/06/2014	1 m													
22/09/2014	3 m													
21/10/2014	4 m													
19/12/2014	6 m													
13/01/2015	7 m													
14/02/2015	8 m													

Taula 28. Resum dels principals gèneres aïllats de la llet d'Euga 1 (Jade) al llarg de dues gestacions no consecutives. La primera columna detalla la data d'extracció de la mostra de llet.

La segona, el mes de gestació (m). Les caselles en verd indiquen la detecció del microorganisme.

Euga 2 (Jaine)		<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	Enterobacteriaceae	Coliformes	<i>Saccharomyces</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Kocuria</i> spp.	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Hypomicrobium</i> spp.	<i>Cellulomonas</i> spp.	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Burkholderia</i> sp.	<i>Pantoea</i> sp.
1/01/2013	8 m															
4/02/2013	9 m															
7/03/2013	10 m															
2/04/2013	11 m															
30/06/2014	1 m															
22/09/2014	3 m															
21/10/2014	4 m															
19/12/2014	6 m															
13/01/2015	7 m															
14/02/2015	8 m															

Taula 29. Resum dels principals gèneres aïllats de la llet d'Euga 2 (Jaine) al llarg de dues gestacions no consecutives. La primera columna detalla la data d'extracció de la mostra de llet. La segona, el mes de gestació (m). Les caselles en verd indiquen la detecció del microorganisme.

1.4. Identificacions a nivell d'espècie de les soques d'interès

Les caracteritzacions es van dur a terme en alguns casos a nivell de gènere i en altres casos a nivell d'espècie. Aquest fet va dependre de la importància patològica o probiòtica del microorganisme aïllat, així com de la capacitat del sistema API[®] per arribar a identificar certes espècies.

Les principals espècies d'interès aïllades al llarg de l'estudi es detallen a la Taula 30.

Microorganisme	Procedència m= mes gestació	Medi de creixement	Condicions creixement	Morfologia	Gram
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	Euga 2, 8 m ^(a)	MRS agar	37°C, 5% CO ₂	Bacil·lar	Positiu
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	Euga 2, 10 m ^(a)	MRS agar	37°C, An	Bacil·lar	Positiu
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	Euga 1, 7 m ^(a)	MRS agar	37°C, Ae	Bacil·lar	Positiu
<i>Lactobacillus plantarum</i> 4	Euga 2, 3 m ^(b)	MRS agar	37°C, An	Bacil·lar	Positiu
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5	Euga 1, 8 m ^(b)	MRS agar	37°C, 5% CO ₂	Bacil·lar	Positiu
<i>Lactobacillus plantarum</i> 6	Euga 1, 8 m ^(b)	MRS agar	37°C, Ae	Bacil·lar	Positiu
<i>Lactococcus lactis</i>	Euga 2, 7 m ^(b)	MRS agar	37°C, An	Coc en cadenes	Positiu
<i>Enterococcus durans</i>	Euga 2, 6 m ^(b)	AZ agar	42°C, Ae	Coc en cadenes	Positiu
<i>Enterococcus faecium</i>	Euga 2, 10 m ^(a)	AZ agar	42°C, Ae	Coc en cadenes	Positiu
<i>Staphylococcus aureus</i>	Euga 1, 6 m ^(b)	BP agar	37°C, Ae	Coc en raïms	Positiu
<i>Enterobacter amnigenus</i>	Euga 2, 3 m ^(b)	MC agar	37°C, Ae	Bacil·lar	Negatiu
<i>Enterobacter cloacae</i>	Euga 1, 4 m ^(b)	MC agar	37°C, Ae	Bacil·lar	Negatiu
<i>Burkholderia cepacia</i>	Euga 1+2, 8 m ^(b)	MC agar	37°C, Ae	Bacil·lar	Negatiu

Taula 30. Principals espècies d'interès procedents de les llets d'Euga1 i 2, identificades mitjançant sistemes miniaturitzats API[®]. (a)= llet de la primera gestació. (b)= llet de la tercera gestació. Ae= aerobiosi. An= anaerobiosi.

2. Caracterització enzimàtica de la llet d'euga al llarg de la gestació

2.1. Resultats de les activitats enzimàtiques detectades en la llet d'euga mitjançant API ZYM[®]

2.1.1. Taules activitats enzimàtiques d'Euga 1 i d'Euga 2

Activitat enzimàtica llet Jade											
Mes gestació	FAL	EC4	ELC8	LEUA	VALA	TRP	FAC	NFH	βGLUN	NABG	αFUC
8	2,5	15	7,5	35	5	0	2,5	5	5	0	0
9	7,5	30	20	30	7,5	0	5	2,5	10	2,5	2,5
10	5	30	15	30	5	0	2,5	5	5	2,5	0
11	2,5	30	10	30	5	0	5	5	15	2,5	0
1	10	20	10	5	5	5	5	0	0	0	0
3	10	35	25	15	15	0	5	0	2,5	0	0
4	5	30	25	10	20	0	20	5	5	2,5	0
6	10	15	5	15	5	0	7,5	2,5	7,5	2,5	2,5
7	20	7,5	10	10	5	0	2,5	2,5	5	0	0
8	30	20	10	10	7,5	0	10	7,5	10	0	5
8 (2)	40	25	30	40	40	0	25	30	30	0	20

Taula 31. Activitats enzimàtiques de la llet d'Euga 1 (Jade) mesurades amb el sistema API ZYM[®] al llarg de dues gestacions no consecutives. Els valors s'expressen en quantitat de nanomols de substrat hidrolitzats per l'enzim. FAL= fosfatasa alcalina. EC4= esterasa C:4. ELC8= esterasa lipasa C:8. LEUA= leucina arilamidasa. VALA= valina arilamidasa. TRP= tripsina. FAC= fosfatasa àcida. NFH= Naftol-AS-bi-fosfohidrolasa. βGLUN= β-glucuronidasa. NABG= N-acetil-β-glucosaminidasa. αFUC= α-fucosidasa. (2)= mostra post deslletament.

Activitat enzimàtica llet Jaine

Mes gestació	FAL	EC4	ELC8	LEUA	VALA	CISA	TRP	FAC	NFH	β GLUN	β GLUC	NABG	α FUC
8	2,5	30	7,5	30	5	0	0	10	2,5	2,5	0	5	2,5
9	10	30	20	30	7,5	0	0	5	2,5	10	0	15	2,5
10	2,5	25	7,5	35	7,5	0	0	30	2,5	5	0	7,5	0
11	5	10	5	20	2,5	0	0	2,5	2,5	5	0	5	0
2	5	5	5	10	20	0	7,5	5	20	0	0	2,5	0
4	5	30	20	20	15	0	0	0	5	0	0	2,5	0
5	10	40	35	20	20	5	5	5	0	0	10	0	0
6	5	15	7,5	25	2,5	0	0	7,5	5	5	0	5	2,5
7	5	10	7,5	10	5	0	0	10	5	5	0	7,5	0
8	30	20	20	15	7,5	0	0	10	7,5	10	0	0	5
8 (2)	40	10	7,5	15	15	0	0	40	40	40	0	0	0

Taula 32. Activitats enzimàtiques de la llet d'Euga 2 (Jaine) mesurades amb el sistema API ZYM[®] al llarg de dues gestacions no consecutives. Els valors s'expressen en quantitat de nanomols de substrat hidrolitzats per l'enzim. FAL= fosfatasa alcalina. EC4= esterasa C:4. ELC8= esterasa lipasa C:8. LEUA= leucina arilamidasa. VALA= valina arilamidasa. TRP= tripsina. FAC= fosfatasa àcida. NFH= Naftol-AS-bi-fosfohidrolasa. β GLUN= β -glucuronidasa. NABG= N-acetil- β -glucosaminidasa. α FUC= α -fucosidasa. β GLUC= β -glucosidasa. CISA= cistina arilamidasa. (2)= mostra post deslletament.

Les taules 31 i 32 ens mostren l'evolució de les activitats enzimàtiques de la llet d'Euga 1 i Euga 2 al llarg de les dues gestacions durant les quals es va poder obtenir mostra. A continuació, a la Taula 33 es poden observar alguns paràmetres estadístics referents a les dades anteriors. La Taula 34 detalla en percentatges els enzims que van mostrar activitat del total d'enzims que es van assajar, mentre que la Taula 35 mostra la regularitat amb la que aquesta activitat es va manifestar.

	Euga 1	Euga 2
Mitjana	110,45	110,45
Mediana	105,00	97,50
Variància	3646,02	1888,52
Desviació estàndard	60,38	43,46

Taula 33. Paràmetres estadístics de l'activitat enzimàtica total de la llet de les dues euges, expressats en nanomols de substrat enzimàtic hidrolitzat en API ZYM[®].

Euga 1 (Jade)			Euga 2 (Jaine)		
Mes gestació	nº enzims detectats/ total enzims API ZYM	Percentatge enzims positius	Mes gestació	nº enzims detectats/ total enzims API ZYM	Percentatge enzims positius
8	8/19	42,11	8	10/19	52,63
9	10/19	52,63	9	10/19	52,63
10	9/19	47,37	10	9/19	47,37
11	9/19	47,37	11	9/19	47,37
2	7/19	36,84	2	9/19	47,37
4	7/19	36,84	4	7/19	36,84
5	9/19	47,37	5	9/19	47,37
6	10/19	52,63	6	10/19	52,63
7	8/19	42,11	7	9/19	47,37
8	9/19	47,37	8	9/19	47,37
8 (2)	9/19	47,37	8 (2)	8/19	42,11

Taula 34. Nombre d'enzims del sistema API ZYM[®] que mostren activitat a la llet d'Euga 1 i d'Euga 2 respecte al total d'activitats mesurables pel mètode. (2)= mostra post deslletament.

Euga 1 (Jade)			Euga 2 (Jaine)		
Enzim constitutiu	presència /total preses de mostra	Percentatge presència	Enzim constitutiu	presència /total preses de mostra	Percentatge presència
FAL	11/11	100,00	FAL	11/11	100,00
EC4	11/11	100,00	EC4	11/11	100,00
ELC8	11/11	100,00	ELC8	11/11	100,00
LEUA	11/11	100,00	LEUA	11/11	100,00
VALA	11/11	100,00	VALA	11/11	100,00
CISA	0/11	0,00	CISA	1/11	9,09
TRP	1/11	9,09	TRP	2/11	18,18
FAC	11/11	100,00	FAC	10/11	90,91
NFH	9/11	81,82	NFH	10/11	90,91
βGLUN	10/11	90,91	βGLUN	8/11	72,73
βGLUC	0/11	0,00	βGLUC	1/11	9,09
NABG	5/11	45,45	NABG	8/11	72,73
αFUC	4/11	36,36	αFUC	4/11	36,36

Taula 35. Relació entre el total de mostres de llet d'euga analitzades i aquelles que van donar resultat positiu a cada enzim determinat. FAL= fosfatasa alcalina. EC4= esterasa C:4. ELC8= esterasa lipasa C:8. LEUA= leucina arilamidasa. VALA= valina arilamidasa. TRP= tripsina. FAC= fosfatasa àcida. NFH= Naftol-AS-bi-fosfohidrolasa. βGLUN= β-glucuronidasa. NABG= N-acetil-β-glucosaminidasa. αFUC= α-fucosidasa. βGLUC= β-glucosidasa. CISA= cistina arilamidasa.

2.1.2. Figures de les activitats enzimàtiques totals

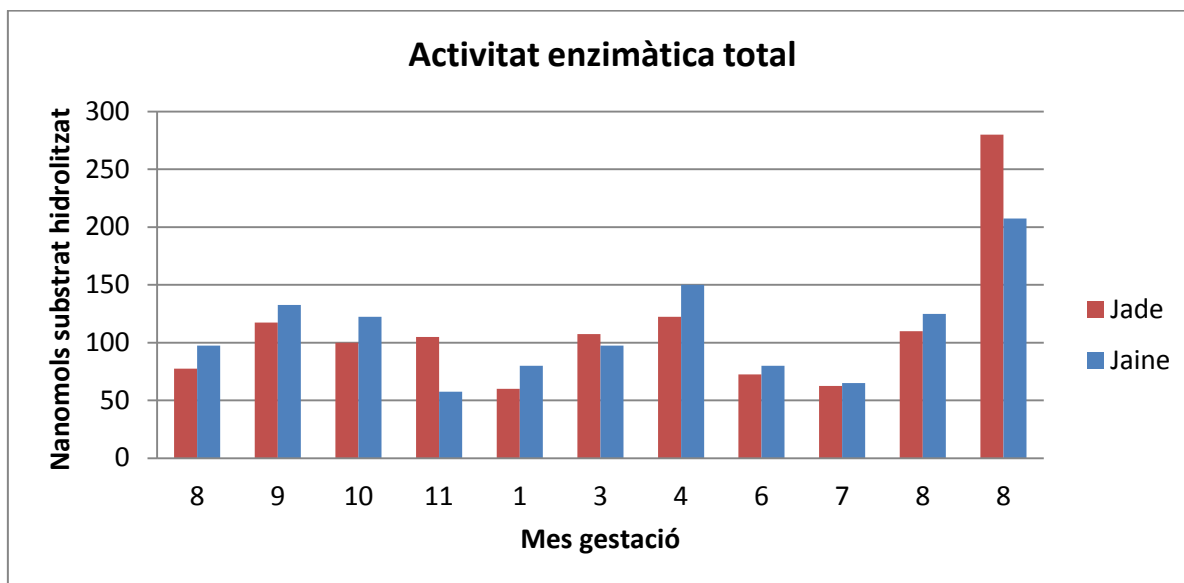


Figura 15. Sumatori de les diferents activitats enzimàtiques mostrades per les llets d'Euga 1 i Euga 2 al llarg de dues gestacions no consecutives mesurada amb el sistema API ZYM®.

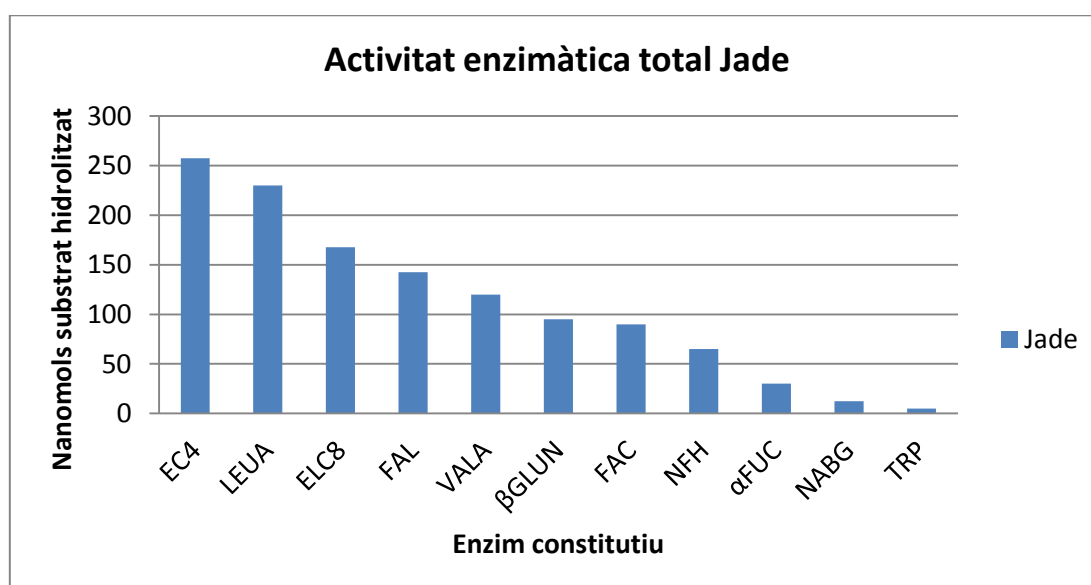


Figura 16. Activitat enzimàtica total de les llets de Euga 1 (Jade) mesurada amb el sistema API ZYM®. Les activitats han estat ordenades de major a menor intensitat, i són producte de la suma de 11 preses de mostra al llarg de dues gestacions no consecutives. EC4= esterasa C:4. LEUA= leucina arilamidasa. ELC8= esterasa lipasa C:8. FAL= fosfatasa alcalina. VALA= valina arilamidasa. βGLUN= β-glucuronidasa. FAC= fosfatasa àcida. NFH= Naftol-AS-bi-fosfohidrolasa. αFUC= α-fucosidasa. NABG= N-acetil-β-glucosaminidasa. TRP= tripsina.

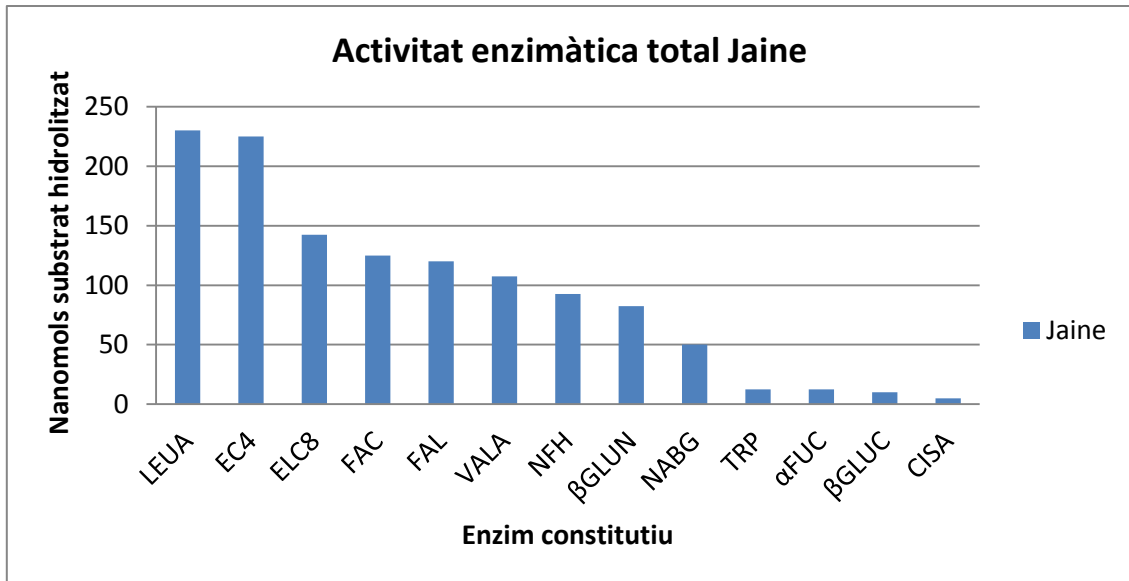


Figura 17. Activitat enzimàtica total de la llet d'Euga 2 (Jaine) mesurada amb API ZYM[®]. Les activitats han estat ordenades de major a menor intensitat, i són producte de la suma de 11 preses de mostra al llarg de dues gestacions no consecutives. EC4= esterasa C:4. LEUA= leucina arilamidasa. ELC8= esterasa lipasa C:8. FAL= fosfatasa alcalina. VALA= valina arilamidasa. βGLUN= β-glucuronidasa. FAC= fosfatasa àcida. NFH= Naftol-AS-bi-fosfohidrolasa. αFUC= α-fucosidasa. NABG= N-acetil-β-glucosaminidasa. TRP= tripsina. βGLUC= β-glucosidasa. CISA= cistina arilamidasa.

2.1.3. Figures de les activitats de cadascun dels enzims

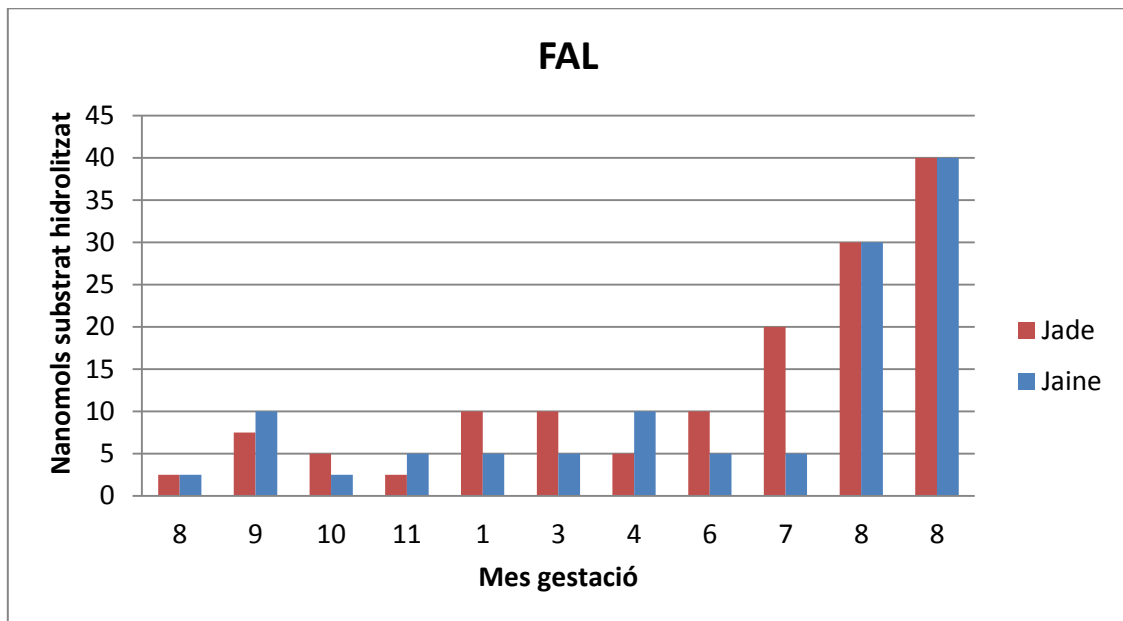


Figura 18. Activitat fosfatasa alcalina (FAL) mostrada per les llets d'Euga 1 i d'Euga 2 al llarg de dues gestacions no consecutives mesurada amb el sistema API ZYM[®].

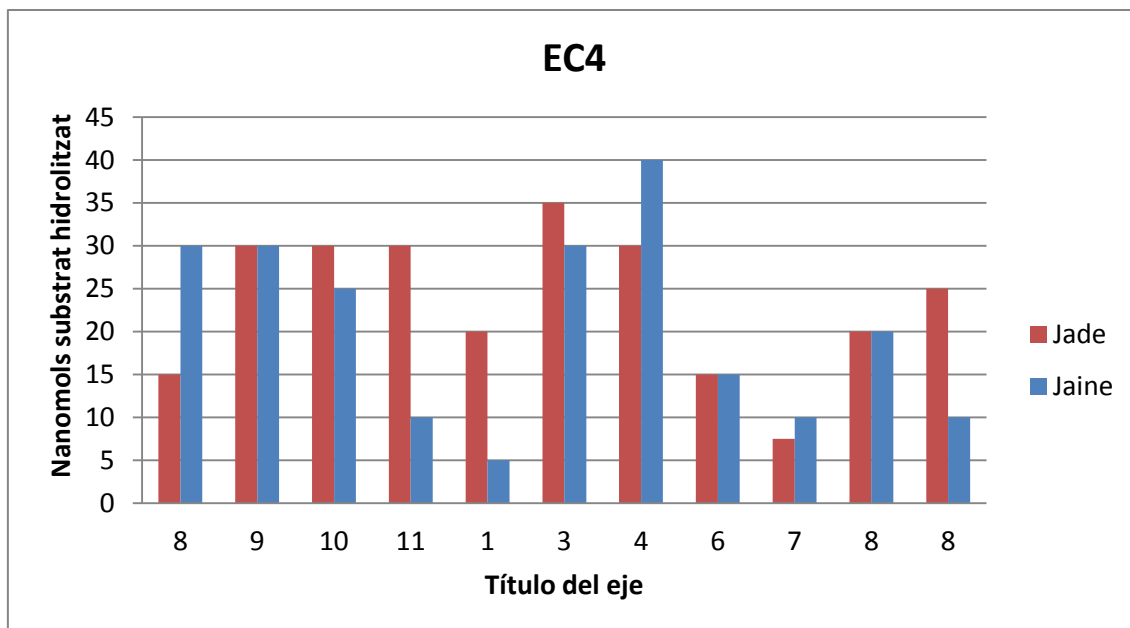


Figura 19. Activitat esterasa C:4 (EC4) mostrada per les llets d'Euga 1 i d'Euga 2 al llarg de dues gestacions no consecutives mesurada amb el sistema API ZYM®.

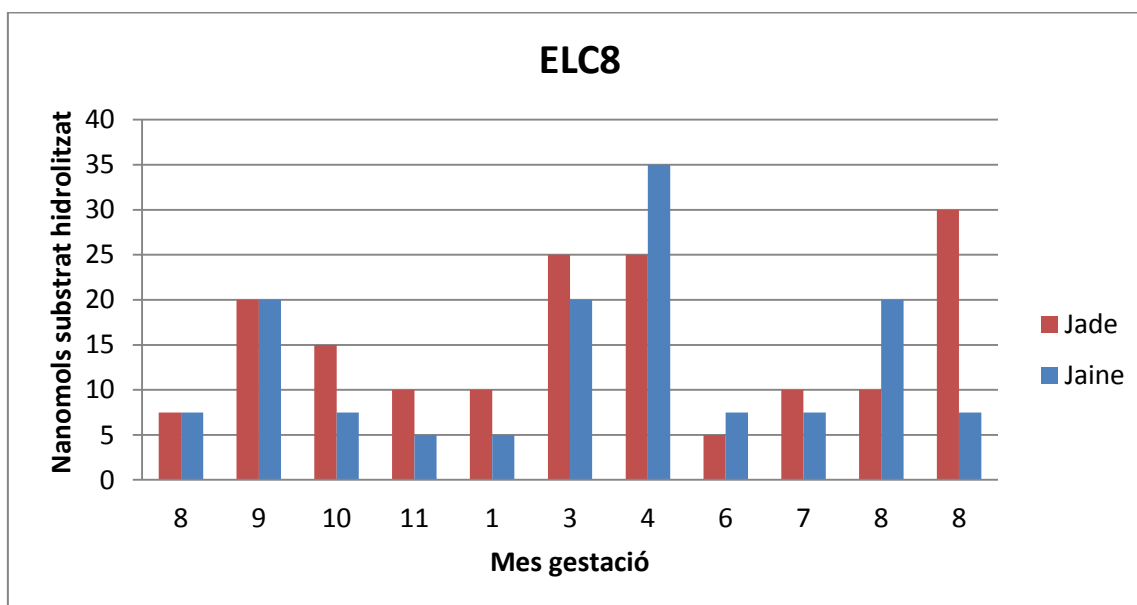


Figura 20. Activitat esterasa lipasa C:8 (ELC8) mostrada per les llets d'Euga 1 i d'Euga 2 al llarg de dues gestacions no consecutives mesurada amb el sistema API ZYM®.

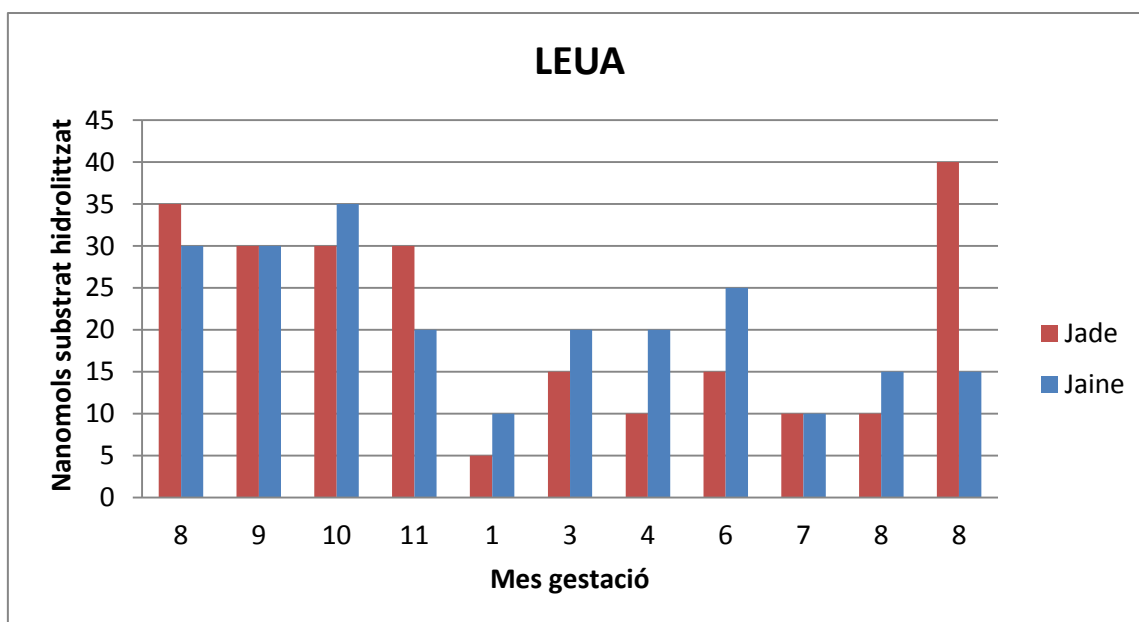


Figura 21. Activitat leucina arilamidasa (LEUA) mostrada per les llets d'Euga 1 i d'Euga 2 al llarg de dues gestacions no consecutives mesurada amb el sistema API ZYM®.

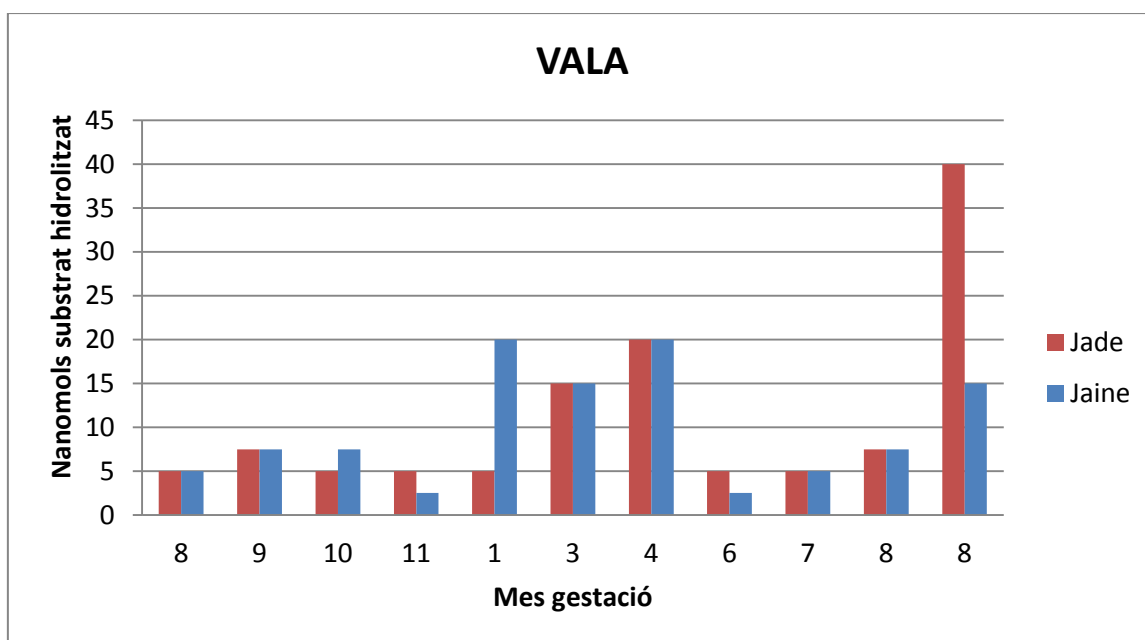


Figura 22. Activitat valina arilamidasa (VALA) mostrada per les llets d'Euga 1 i d'Euga 2 al llarg de dues gestacions no consecutives mesurada amb el sistema API ZYM®.

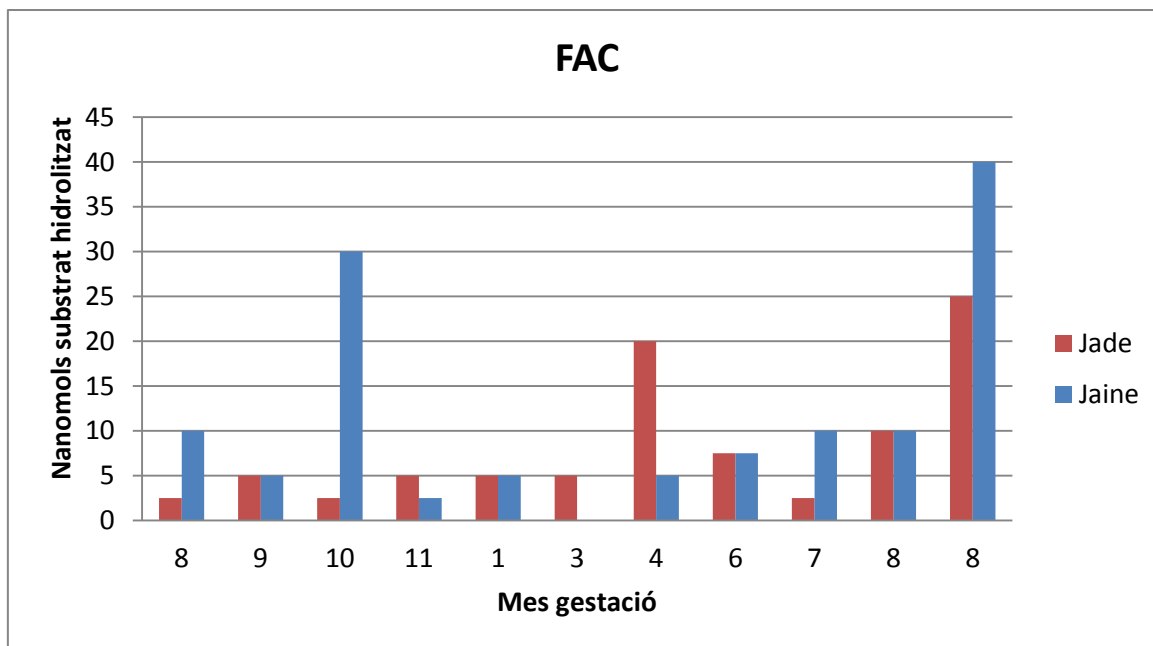


Figura 23. Activitat fosfatasa àcida (FAC) mostrada per les llets de Euga 1 i Euga 2 al llarg de dues gestacions no consecutives mesurada amb el sistema API ZYM®.

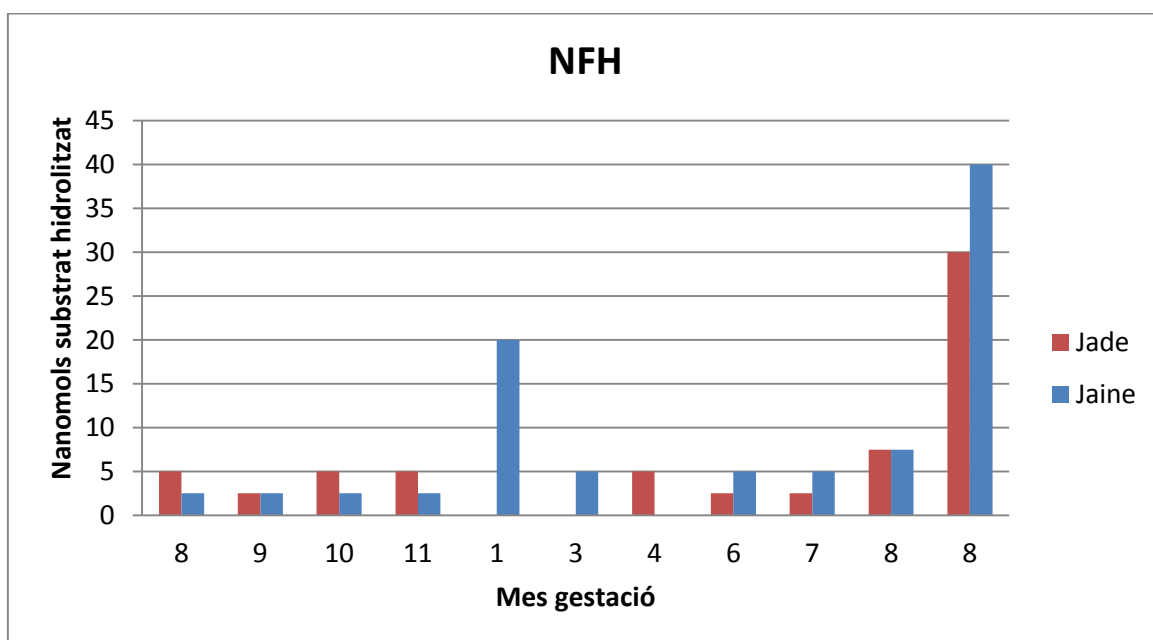


Figura 24. Activitat naftol-AS-bi-fosfohidrolasa (NFH) mostrada per les llets d'Euga 1 i d'Euga 2 al llarg de dues gestacions no consecutives mesurada amb el sistema API ZYM®.

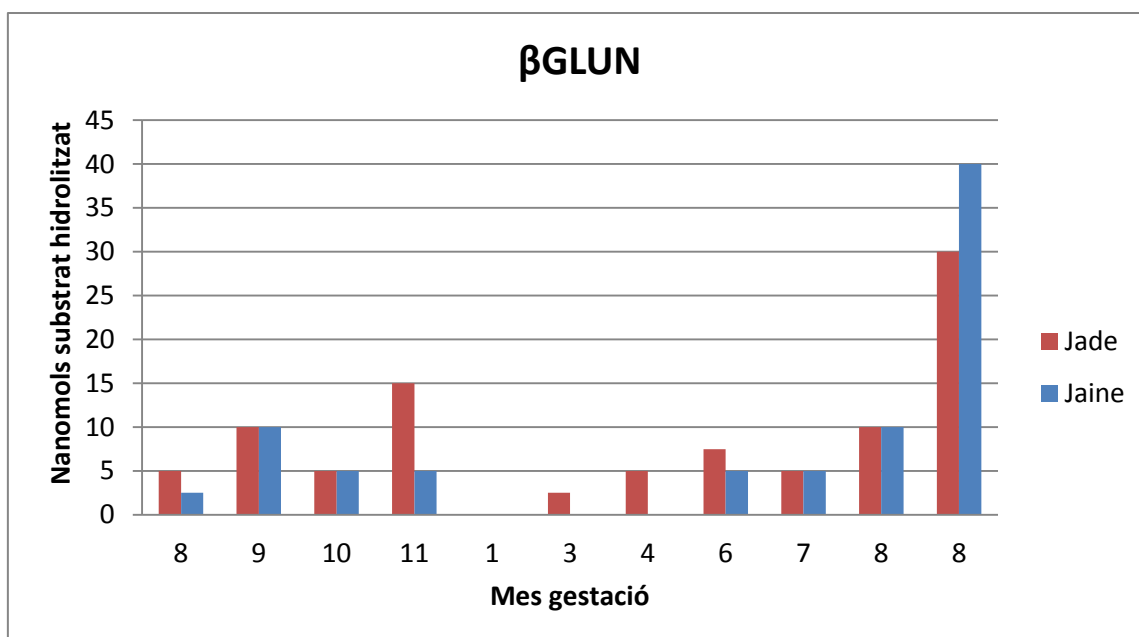


Figura 25. Activitat β -glucuronidasa (β GLUN) mostrada per les llets d'Euga 1 i d'Euga 2 al llarg de dues gestacions no consecutives mesurada amb el sistema API ZYM[®].

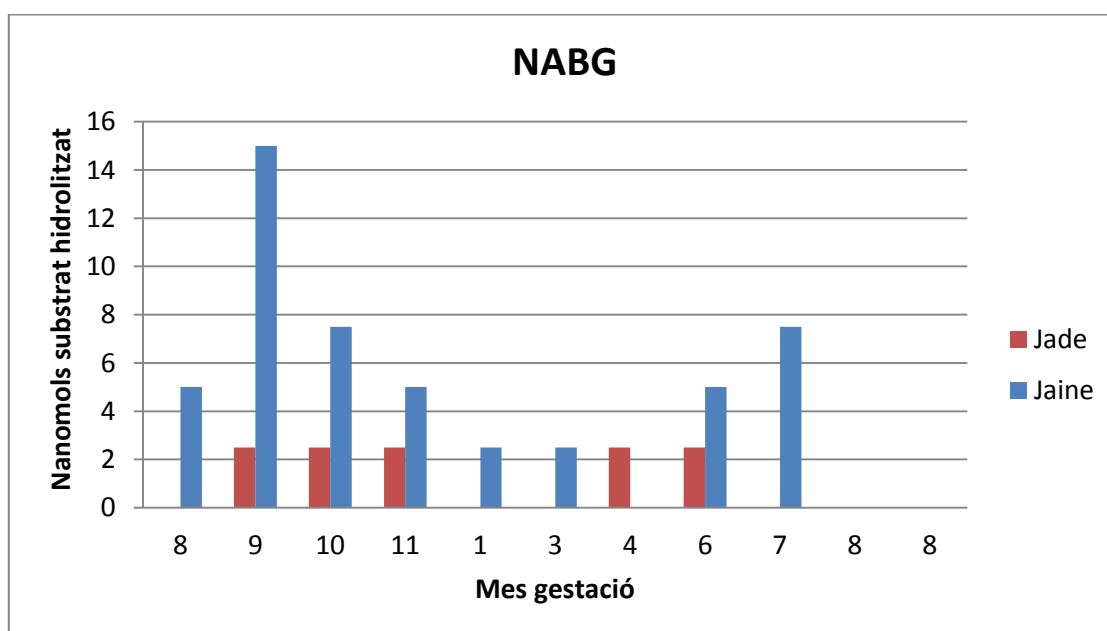


Figura 26. Activitat N-acetil- β -glucosaminidasa (NABG) mostrada per les llets d'Euga 1 i d'Euga 2 al llarg de dues gestacions no consecutives mesurada amb el sistema API ZYM[®].

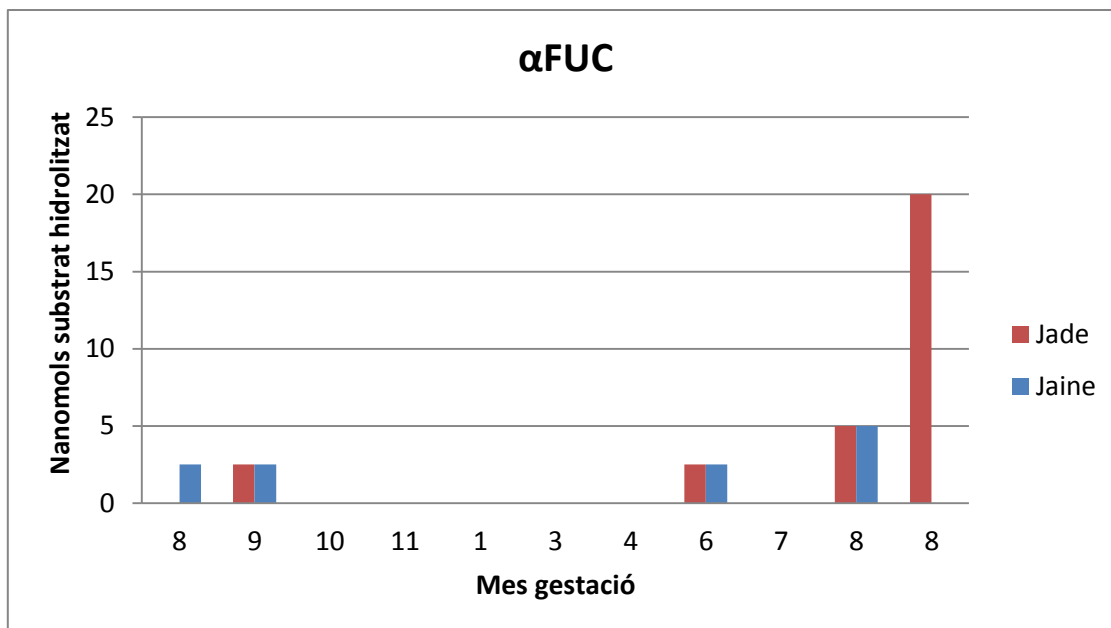


Figura 27. Activitat α -fucosidasa (α FUC) mostrada per les llets de Euga 1 i Euga 2 al llarg de dues gestacions no consecutives mesurada amb el sistema API ZYM[®].

2.2. Resultats de les activitats enzimàtiques detectades en la llet d'altres espècies

2.2.1. Activitat enzimàtica de la llet de truja

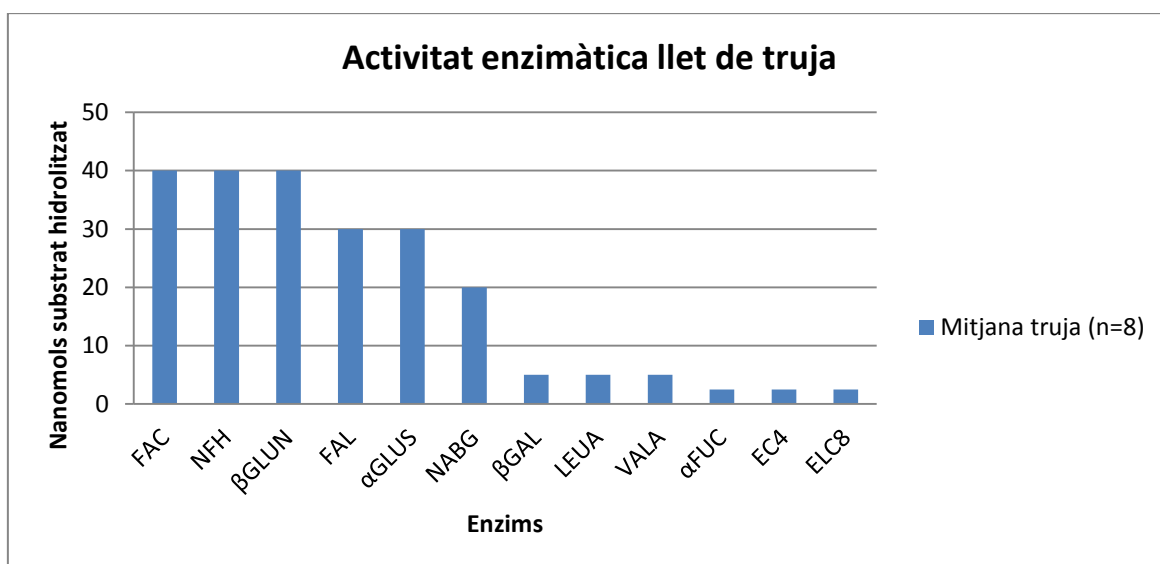


Figura 28. Mitjana de l'activitat enzimàtica total de les llets crues de truja (n=8). Les activitats han estat mesurades amb el sistema API ZYM[®]. FAC= fosfatasa àcida. NFH= Naftol-AS-bi-fosfohidrolasa. β GLUN= β -glucuronidasa. FAL= fosfatasa alcalina. α GLUS= α -glucosidasa. NABG= N-acetil- β -glucosaminidasa. β GAL= β -galactosidasa. LEUA= leucina arilamidasa. VALA= valina arilamidasa. α FUC= α -fucosidasa. EC4= esterasa C:4. ELC8= esterasa lipasa.

2.2.2. Activitat enzimàtica de la llet de vaca

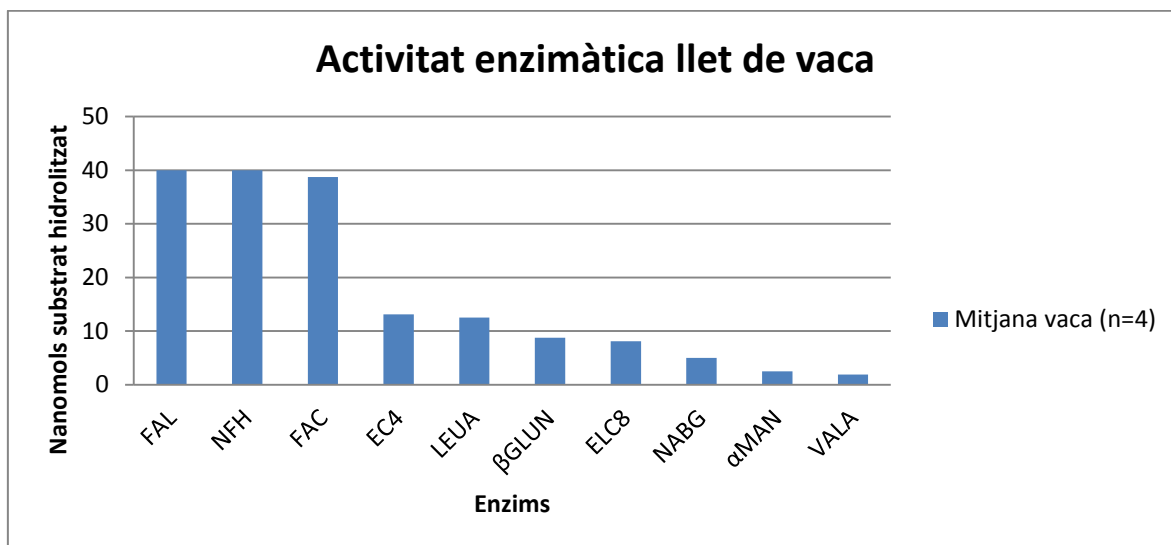


Figura 29. Mitjana de l'activitat enzimàtica total de les llets crues de vaca (n=4). Les activitats han estat mesurades amb el sistema API ZYM[®]. FAL= fosfatasa alcalina. NFH= Naftol-AS-bi-fosfohidrolasa. FAC= fosfatasa àcida. EC4= esterasa C:4. LEUA= leucina arilamidasa. βGLUN= β-glucuronidasa. ELC8= esterasa lipasa. NABG= N-acetil-β-glucosaminidasa. αMAN= α-manosidasa. VALA= valina arilamidasa.

3. Potencial probiòtic dels bacteris àcid làctics de la llet d'euga

3.1. Resultats de la selecció de soques BAL potencialment probiòtiques

3.1.1. Resum de les principals característiques de les soques pre-seleccionades

Nom de la soca	Medi de creixement	Gram	Catalasa	Morfologia	Tinció espores
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	MRS agar 37°C	Positiu	Negatiu	Bacil·lar	Negativa
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	MRS agar 37°C	Positiu	Negatiu	Bacil·lar	Negativa
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	MRS agar 37°C	Positiu	Negatiu	Bacil·lar	Negativa
<i>Lactobacillus plantarum</i> 4	MRS agar 37°C	Positiu	Negatiu	Bacil·lar	Negativa
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5	MRS agar 37°C	Positiu	Negatiu	Bacil·lar	Negativa
<i>Lactobacillus plantarum</i> 6	MRS agar 37°C	Positiu	Negatiu	Bacil·lar	Negativa
<i>Lactococcus lactis</i>	MRS agar 37°C	Positiu	Negatiu	Coc en cadenes	Negativa
<i>Enterococcus durans</i>	MRSb/ AZ 37°C/42°C	Positiu	Negatiu	Coc en cadenes	Negativa
<i>Enterococcus faecium</i>	MRSb/ AZ 37°C/42°C	Positiu	Negatiu	Coc en cadenes	Negativa

Taula 36. Principals característiques presentades per les soques pre-seleccionades com a potencialment probiòtiques. MRS= Man Rogosa Sharpe. MRSb=brou Man Rogosa Sharpe. AZ= Glucosa Azida Broth +15% Agar.

3.2. Resultats de l'avaluació de la seguretat de les soques pre-seleccionades

3.2.1. Anàlisi de la sensibilitat als antibiòtics

	Sensibilitat a antibiòtics								
	C	E	TE	S	K	CD	VA	AMP	GN
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	S	S	S	S	S	S	R	S	S
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299V	S	S	S	n.r.	S	S	n.r.	S	S
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	S	S	S	n.r.	S	S	n.r.	S	S
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	S	S	S	n.r.	S	S	n.r.	S	S
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	S	S	S	n.r.	S	S	n.r.	S	S
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	S	S	S	R	S	R	n.r.	S	S
<i>Lactobacillus brevis</i> 2	S	S	S	S	S	S	n.r.	S	S
<i>Lactobacillus plantarum</i> 4	S	S	S	n.r.	S	R	n.r.	S	S
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5	S	S	S	n.r.	S	S	n.r.	S	S
<i>Lactobacillus plantarum</i> 6	S	S	S	n.r.	S	R	n.r.	S	S
<i>Lactococcus lactis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Enterococcus durans</i>	S	S	S	R	S	S	S	S	S
<i>Enterococcus faecium</i>	S	S	R	S	S	S	R	S	S

Taula 37. Avaluació de la sensibilitat als antibiòtics requerits per la EFSA per als probiòtics. Les dues primeres soques provenen de productes probiòtics comercials. La resta de les soques procedeixen de la llet d'Euga 1 i Euga 2. n.r.= no requerit. C= cloramfenicol. E= eritromicina. TE= tetraciclina. S= estreptomina. K= kanamicina. CD= clindamicina. VA= vancomicina. AMP= ampicil·lina. GN= gentamicina. S= soca sensible. R= soca resistent.

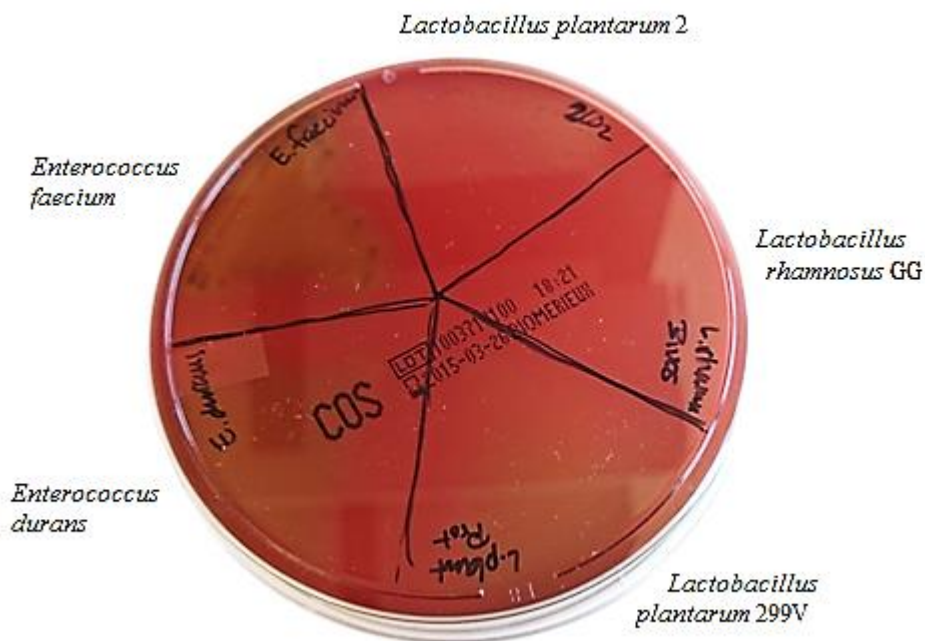
3.2.2. Anàlisi de la capacitat hemolítica

Nom de la soca	Hemòlisi (COS)
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	Gamma
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	Gamma
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	Gamma
<i>Lactobacillus plantarum</i> 4	Gamma
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5	Alfa
<i>Lactobacillus plantarum</i> 6	Gamma
<i>Lactococcus lactis</i>	Gamma
<i>Enterococcus durans</i>	Alfa
<i>Enterococcus faecium</i>	Alfa

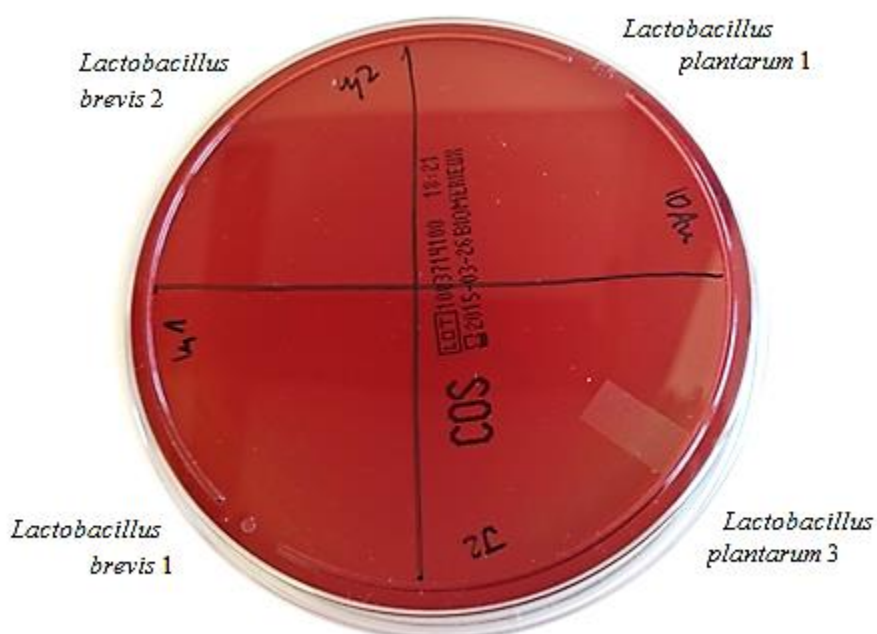
Taula 38. Resultats de l'anàlisi de la capacitat hemolítica de les soques de llet d'euga potencialment probiòtiques. COS= Columbia Sheep blood Agar (Agar amb Sang).



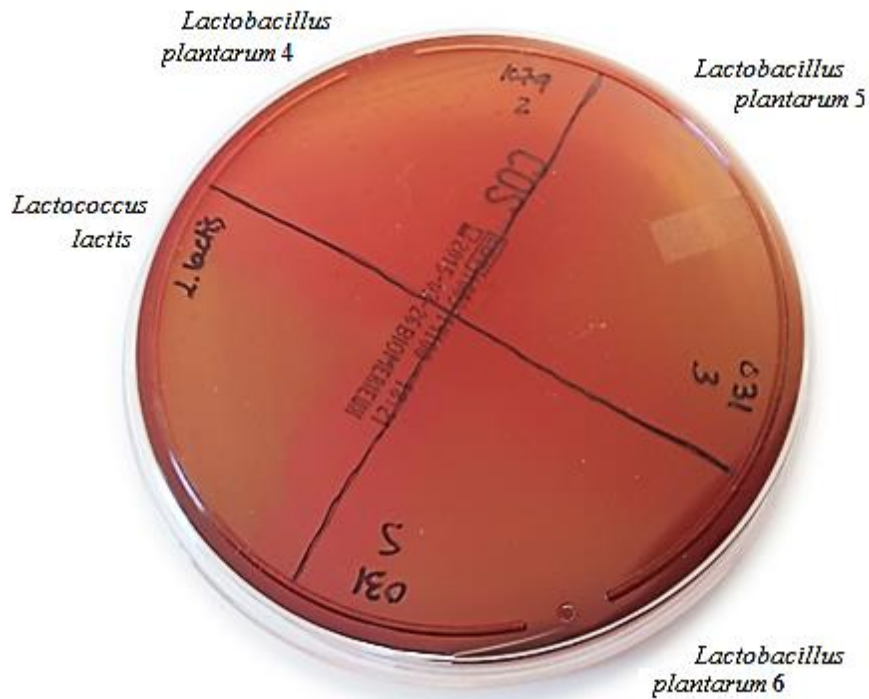
Imatge 31. Detall de l'anvers d'una placa d'Agar amb Sang amb creixement de colònies làctiques gamma hemolítiques.



Imatge 32. Visualització del revers d'una placa d'Agar amb Sang amb creixements de diverses soques làctiques de llet d'euga i dues soques probiòtiques comercials. Es pot apreciar la presència d'alfa hemòlisi (*Enterococcus faecium* i *Enterococcus durans*) com un halo verdós a la zona de creixement.



Imatge 33. Visualització del revers d'una placa d'Agar amb Sang amb creixements de diverses soques làctiques de llet d'euga. No s'aprecia hemòlisi.



Imatge 34. Detall de l'anvers d'una placa d'Agar amb Sang amb creixement de colònies làctiques gamma hemolítiques.

3.3. Resultats de l'assaig de resistència a les condicions gastrointestinals

Els resultats obtinguts de l'avaluació de la resistència de les soques de BAL a les condicions físico-químiques gastrointestinals es resumeixen a la Taula 39.

Es van seleccionar com a resistents a les condicions gastrointestinals les soques que van presentar les següents característiques:

- CMI igual o superior a 300 µg/mL de lisozim.
- Resistència a pH entre 2 i 4.
- Capacitat de creixement en un 0,3% de sals biliars.
- CMI igual o superior a 30 µg/mL de Perdrogen® (H₂O₂).

Soca	Sals biliars (%p/v)	pH	Lisozim ($\mu\text{g/mL}$)	H ₂ O ₂ ($\mu\text{g/mL}$)	Resistència <i>in vitro</i> condicions GI
<i>L. plantarum</i> 1	0.5 – 1	2	>300	>30	Sí
<i>L. plantarum</i> 2	>1	<2	>300	>30	Sí
<i>L. plantarum</i> 3	>1	<2	>300	>30	Sí
<i>L. plantarum</i> 4	>1	<2	>300	>30	Sí
<i>L. plantarum</i> 5	>1	<2	>300	>30	Sí
<i>L. plantarum</i> 6	>1	<2	>300	>30	Sí
<i>L. lactis</i>	0.5 – 1	5	>300	>30	No
<i>E. faecium</i>	>1	<2	>300	>30	Sí
<i>E. durans</i>	0.5 – 1	5	>300	>30	No
<i>L. brevis</i> 1	>1	<2	>300	>30	Sí
<i>L. brevis</i> 2	>1	<2	>300	>30	Sí

Taula 39. Resultats de l'assaig de resistència a les condicions gastrointestinals (GI) de les soques làctiques assajades.

4. Producció de substàncies antimicrobianes

4.1. Resultats de l'assaig de difusió en agar

4.1.1. Resultats de la mesura del pH del sobrenedant

Gènere i espècie	pH 24 h MRSb	Temperatura
Brou MRS sense cultiu	6,4	24,9°C
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	3,88	25°C
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	3,93	25°C
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	3,89	25°C
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	3,87	25°C
<i>Lactobacillus brevis</i> 2	4,8	25,1°C
<i>Lactobacillus plantarum</i> 4	3,9	25°C
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5	3,88	24,8°C
<i>Lactobacillus plantarum</i> 6	3,88	25°C
<i>Lactococcus lactis</i>	4,48	25,1°C
<i>Enterococcus durans</i>	4,47	25°C
<i>Enterococcus faecium</i>	4,7	25°C

Taula 40. Resultats de la mesura del pH del brou de cultiu Man Rogosa Sharpe (MRSb) a les 24 hores d'incubació de diferents soques de bacteris àcid làctics equins.

4.1.2. Resultats de l'assaig de difusió en agar. Taules.

De la taula 41 a la taula 51 es mostren els valors d'inhibició obtinguts al posar en contacte diversos microorganismes alteradors o patògens amb les diverses soques de BAL equines.

<i>Lactobacillus plantarum 1</i>				
	Sobrenedant	80°C 10 min	Pellet	pH 7
<i>Salmonella enterica</i>	2,7	2,5	0	0
<i>Pantoea sp.</i>	3,8	2,95	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	6,5*	6,5*	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3,25	3	0	0
<i>Escherichia coli</i>	2,75	2,75	0	0
<i>Stahylococcus aureus</i>	2,45	1,7	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	2,2	1,65	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	1,2	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	2,25	2,25	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,6	1,65	0,5*	0
<i>Kocuria rhizophila</i>	3,55	2,15	1,1	0

Taula 41. Resultats dels valors d'inhibició obtinguts mitjançant el test de difusió en agar de la soca *Lactobacillus plantarum 1* enfront a diversos microorganismes *halos parcial.

<i>Lactobacillus plantarum 2</i>				
	Sobrenedant	80°C 10 min	Pellet	pH 7
<i>Salmonella enterica</i>	1,35	1,35	0	0
<i>Pantoea sp.</i>	2,55	2,45	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	0,95	1,5	0,9	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,3	1,5	0,6	0
<i>Escherichia coli</i>	2,05	2	0	0
<i>Stahylococcus aureus</i>	1,1	0,6	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	3,25	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,45	2,1	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	1,55	1,55	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	0	0
<i>Kocuria rhizophila</i>	4,75	6	2,25	0

Taula 42. Resultats dels valors d'inhibició obtinguts mitjançant el test de difusió en agar de la soca *Lactobacillus plantarum 2* enfront a diversos microorganismes *halos parcial.

<i>Lactobacillus plantarum</i> 3				
	Sobrenedant	80°C 10 min	Pellet	pH 7
<i>Salmonella enterica</i>	2,6	2,5	0	0
<i>Pantoea</i> sp.	3,25	3	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	2,25*	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,75	2,5*	1*	0
<i>Escherichia coli</i>	2,75	2,55	0	0
<i>Stahylococcus aureus</i>	2,25	2,05	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	1,55	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,75	2,45	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	2,3	0,5	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	1,25	0,5	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,95	2,65	0	0
<i>Kocuria rhizophila</i>	2,25	4,75	2,5	0

Taula 43. Resultats dels valors d'inhibició obtinguts mitjançant el test de difusió en agar de la soca *Lactobacillus plantarum* 3 enfront a diversos microorganismes *halos parcial.

<i>Lactobacillus brevis</i> 1				
	Sobrenedant	80°C 10 min	Pellet	pH 7
<i>Salmonella enterica</i>	1,55*	1,55*	0	0
<i>Pantoea</i> sp.	3,05	3,05	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	0,55	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	2,25	2	0	0
<i>Stahylococcus aureus</i>	2	1,55	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	2,05	1,55	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,4	1,9	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	2,5*	2,5*	0,75*	0
<i>Bacillus cereus</i>	1,25	0,75	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,05	2,95	0	0
<i>Kocuria rhizophila</i>	4,75	5	2,5	0

Taula 44. Resultats dels valors d'inhibició obtinguts mitjançant el test de difusió en agar de la soca *Lactobacillus brevis* 1 enfront a diversos microorganismes *halos parcial.

<i>Lactobacillus brevis 2</i>				
	Sobrenedant	80°C 10 min	Pellet	pH 7
<i>Salmonella enterica</i>	0	0	0	0
<i>Pantoea sp.</i>	1*	0	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0
<i>Stahylococcus aureus</i>	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	1*	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	0,5*	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1*	1	0	0
<i>Kocuria rhizophila</i>	1*	1*	0	0

Taula 45. Resultats dels valors d'inhibició obtinguts mitjançant el test de difusió en agar de la soca *Lactobacillus brevis 2* enfront a diversos microorganismes *halos parcial.

<i>Lactobacillus plantarum 4</i>				
	Sobrenedant	80°C 10 min	Pellet	pH 7
<i>Salmonella enterica</i>	1,75*	1,5*	0	0
<i>Pantoea sp.</i>	3,45	2,3	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	0,5*	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,15*	1,55*	0	0
<i>Escherichia coli</i>	2,05	2,45	0	0
<i>Stahylococcus aureus</i>	1,55	1,25*	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,5*	1*	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,05*	2,45*	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	2,5*	2,25*	1*	0
<i>Bacillus cereus</i>	1	1,75	0,5	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,75	2,7	0	0
<i>Kocuria rhizophila</i>	4,5	4,75	2,5	0

Taula 46. Resultats dels valors d'inhibició obtinguts mitjançant el test de difusió en agar de la soca *Lactobacillus plantarum 4* enfront a diversos microorganismes *halos parcial.

<i>Lactobacillus plantarum 5</i>				
	Sobrenedant	80°C 10 min	Pellet	pH 7
<i>Salmonella enterica</i>	2,5*	2,5*	1,25*	0
<i>Pantoea sp.</i>	0	0	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,25*	2,75*	1,5	0
<i>Escherichia coli</i>	2,25*	2,25*	0	0
<i>Stahylococcus aureus</i>	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,75*	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	2,75	3	0,5	0
<i>Bacillus cereus</i>	0,5	1*	1,25	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,25	2,25	0,5	0
<i>Kocuria rhizophila</i>	5	4,5	2,25	0

Taula 47. Resultats dels valors d'inhibició obtinguts mitjançant el test de difusió en agar de la soca *Lactobacillus plantarum 5* enfront a diversos microorganismes *halos parcial.

<i>Lactobacillus plantarum 6</i>				
	Sobrenedant	80°C 10 min	Pellet	pH 7
<i>Salmonella enterica</i>	2,3*	2*	0,5	0
<i>Pantoea sp.</i>	4*	1,5	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4,2*	3,8*	0	0
<i>Escherichia coli</i>	2*	2*	0	0
<i>Stahylococcus aureus</i>	0,5*	0,5*	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,5*	2,5*	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	2,25*	2,25*	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	1,5	1,5	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,5*	2*	0	0
<i>Kocuria rhizophila</i>	4,3	4	2,2	0

Taula 48. Resultats dels valors d'inhibició obtinguts mitjançant el test de difusió en agar de la soca *Lactobacillus plantarum 6* enfront a diversos microorganismes *halos parcial.

<i>Lactococcus lactis</i>				
	Sobrenedant	80°C 10 min	Pellet	pH 7
<i>Salmonella enterica</i>	0	0,75	0	0
<i>Pantoea</i> sp.	1,25	1,25	0	1
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0	0	1
<i>Escherichia coli</i>	1*	0	0	0
<i>Stahylococcus aureus</i>	2	2	2	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0,5*	0,5*	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	1*	0,5*	0,5*	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,5*	1,5*	0	0
<i>Kocuria rhizophila</i>	2,25	3,15	0	0

Taula 49. Resultats dels valors d'inhibició obtinguts mitjançant el test de difusió en agar de la soca *Lactococcus lactis* enfront a diversos microorganismes *halos parcial.

<i>Enterococcus durans</i>				
	Sobrenedant	80°C 10 min	Pellet	pH 7
<i>Salmonella enterica</i>	0,5*	0	0	0
<i>Pantoea</i> sp.	1,75	1,75*	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1*	0	0
<i>Escherichia coli</i>	1,25	1,25	0	0
<i>Stahylococcus aureus</i>	1,5	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0,5*	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	0,5*	0,5*	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,5*	0,5*	0	0
<i>Kocuria rhizophila</i>	2,85	2,5	0,6*	0

Taula 50. Resultats dels valors d'inhibició obtinguts mitjançant el test de difusió en agar de la soca *Enterococcus durans* enfront a diversos microorganismes *halos parcial.

<i>Enterococcus faecium</i>				
	Sobrenedant	80°C 10 min	Pellet	pH 7
<i>Salmonella enterica</i>	0	0	0	0
<i>Pantoea</i> sp.	0	0	2,5	0
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0	2,75	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0
<i>Stahylococcus aureus</i>	0	0	5,8	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	2,05	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0
<i>Kocuria rhizophila</i>	3,6	0	4,45	0

Taula 51. Resultats dels valors d'inhibició obtinguts mitjançant el test de difusió en agar de la soca *Enterococcus durans* enfront a diversos microorganismes *halos parcial.

De la taula 52 fins la taula 57 s'organitzen les activitats anteriorment mencionades en percentatges d'activitat de les soques BAL equines assajades. Aquests percentatges fan referència al ventall de microorganismes inhibits tant de forma general com de forma específica per part de cada compost en estudi (sobrenedant, sobrenedant amb diferents tractaments i *pellet*). Només es valora la presència o absència d'halos.

Nom de la soca BAL	Microorganismes inhibits /total microorganismes	Percentatge activitat
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	11/12	91,67
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	11/12	91,67
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	12/12	100,00
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	11/12	91,67
<i>Lactobacillus brevis</i> 2	5/12	41,67
<i>Lactobacillus plantarum</i> 4	12/12	100,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5	8/12	66,67
<i>Lactobacillus plantarum</i> 6	10/12	83,33
<i>Lactococcus lactis</i>	9/12	75,00
<i>Enterococcus durans</i>	9/12	75,00
<i>Enterococcus faecium</i>	5/12	41,67

Taula 52. Relació entre el nombre de microorganismes inhibits per cada soca làctica equina i el total de microorganismes sobre els quals es va realitzar l'assaig.

Nom de la soca BAL	Activitat antimicrobiana present /activitats possibles	Percentatge activitat
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	23/48	47,92
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	23/48	47,92
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	25/48	52,08
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	23/48	47,92
<i>Lactobacillus brevis</i> 2	7/48	14,58
<i>Lactobacillus plantarum</i> 4	26/48	54,17
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5	21/48	43,75
<i>Lactobacillus plantarum</i> 6	22/48	45,83
<i>Lactococcus lactis</i>	19/48	39,58
<i>Enterococcus durans</i>	16/48	33,33
<i>Enterococcus faecium</i>	6/48	12,5

Taula 53. Relació entre l'activitat antimicrobiana mostrada per cada soca làctica equina i el total d'assajos realitzats.

Nom de la soca BAL	Activitat sobrenedant present /activitats possibles	% activitat del sobrenedant
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	11/ 12	91,67
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	11/ 12	91,67
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	12/ 12	100,00
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	11/ 12	91,67
<i>Lactobacillus brevis</i> 2	5/ 12	41,67
<i>Lactobacillus plantarum</i> 4	12/ 12	100,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5	8/ 12	66,67
<i>Lactobacillus plantarum</i> 6	10/ 12	83,33
<i>Lactococcus lactis</i>	8/ 12	66,67
<i>Enterococcus durans</i>	9/ 12	75,00
<i>Enterococcus faecium</i>	1/12	8,33

Taula 54. Relació entre l'activitat antimicrobiana mostrada pel sobrenedant de cada soca làctica equina i el total d'assajos realitzats amb el sobrenedant.

Nom de la soca BAL	Presència activitat <i>pellet</i> /activitats possibles	% activitat del <i>pellet</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	2/ 12	16,67
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	3/ 12	25,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	2/ 12	16,67
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	2/ 12	16,67
<i>Lactobacillus brevis</i> 2	0/ 12	0,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> 4	3/ 12	25,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5	6/ 12	50,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> 6	2/ 12	16,67
<i>Lactococcus lactis</i>	2/ 12	16,67
<i>Enterococcus durans</i>	1/ 12	8,33
<i>Enterococcus faecium</i>	5/12	41,67

Taula 55. Relació entre l'activitat antimicrobiana mostrada pel *pellet* de cada soca làctica equina i el total d'assajos realitzats amb el *pellet*.

Nom de la soca BAL	Presència activitat xoc tèrmic/ activitats possibles	% activitat xoc tèrmic
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	10/ 12	83,33
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	9/ 12	75,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	11/ 12	91,67
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	10/ 12	83,33
<i>Lactobacillus brevis</i> 2	2/ 12	16,67
<i>Lactobacillus plantarum</i> 4	11/ 12	91,67
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5	6/ 12	50,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> 6	10/ 12	83,33
<i>Lactococcus lactis</i>	7/ 12	58,33
<i>Enterococcus durans</i>	6/ 12	50,00
<i>Enterococcus faecium</i>	0/12	0,00

Taula 56. Relació entre l'activitat antimicrobiana mostrada pel sobrenedant sotmès a xoc tèrmic (80°C, 10 min) de cada soca làctica equina i el total d'assajos realitzats amb el sobrenedant sotmès a xoc tèrmic.

Nom de la soca BAL	Presència activitat pH /activitats possibles	% activitat pH
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	0/ 12	0,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	0/ 12	0,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	0/ 12	0,00
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	0/ 12	0,00
<i>Lactobacillus brevis</i> 2	0/ 12	0,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> 4	0/ 12	0,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5	0/ 12	0,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> 6	0/ 12	0,00
<i>Lactococcus lactis</i>	2/ 12	16,67
<i>Enterococcus durans</i>	0/ 12	0,00
<i>Enterococcus faecium</i>	0/12	0,00

Taula 57. Relació entre l'activitat antimicrobiana mostrada pel sobrenedant sotmès a neutralització del pH de cada soca làctica equina i el total d'assajos realitzats amb el sobrenedant sotmès a neutralització del pH.

Les taules 58 i 59 analitzen la presència d'inhibició des del punt de vista del microorganisme alterador o patògen, per tant, valoren la sensibilitat d'aquests a l'acció de les soques BAL equines.

Microorganisme	resultats sensibles/total soques BAL	% sensibilitat
<i>Salmonella enterica</i>	9/ 11	81,81
<i>Pantoea</i> sp.	10/ 11	90,91
<i>Proteus vulgaris</i>	5/ 11	45,45
<i>Klebsiella oxytoca</i>	9/ 11	81,82
<i>Escherichia coli</i>	9/ 11	81,82
<i>Stahylococcus aureus</i>	9/ 11	81,82
<i>Enterococcus faecalis</i>	6/ 11	54,55
<i>Listeria monocytogenes</i>	7/ 11	63,64
<i>Bacillus subtilis</i>	8/ 11	72,73
<i>Bacillus cereus</i>	10/ 11	90,91
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10/ 11	90,91
<i>Kocuria rhizophila</i>	11/ 11	100

Taula 58. Sensibilitat mostrada pels microorganismes alteradors o patògens en relació al total de soques làctiques equines sobre les quals es va realitzar l'assaig.

Microorganisme	Resultats sensibles/total possibles activitats	% sensibilitat
<i>Salmonella enterica</i>	18/ 44	40,90
<i>Pantoea</i> sp.	19/ 44	43,18
<i>Proteus vulgaris</i>	8/ 44	18,18
<i>Klebsiella oxytoca</i>	20/ 44	45,45
<i>Escherichia coli</i>	17/ 44	38,64
<i>Stahylococcus aureus</i>	17/ 44	38,64
<i>Enterococcus faecalis</i>	10/ 44	22,73
<i>Listeria monocytogenes</i>	12/ 44	27,27
<i>Bacillus subtilis</i>	17/ 44	38,64
<i>Bacillus cereus</i>	22/ 44	50,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21/ 44	47,73
<i>Kocuria rhizophila</i>	30/ 44	68,18

Taula 59. Anàlisi de la sensibilitat mostrada pels diversos microorganismes alteradors o patògens assajats envers les soques làctiques equines.

Les taules 60 i 61 ofereixen un resum de les dades referents a les taules 41 a 51. En elles s'han sumat els diversos valors d'inhibició segons el compost estudiat, primer des del punt de vista de cada BAL (valorant l'acció total de cada soca), i posteriorment des del punt de vista del microorganisme alterador o patogen (valorant la sensibilitat general de cada microorganisme al total de soques equines).

Nom de la soca BAL	Suma VI sobrenedant	Suma VI xoc tèrmic	Suma VI pellet	Suma VI pH
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	33,25	27,1	1,6	0
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	24,3	19,05	3,75	0
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	29,35	25	3,5	0
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	25,4	22,8	3,25	0
<i>Lactobacillus brevis</i> 2	4,5	2	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i> 4	24,75	23,95	4	0
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5	20,25	18,25	7,25	0
<i>Lactobacillus plantarum</i> 6	25,05	22,05	2,7	0
<i>Lactococcus lactis</i>	10,5	9,65	2,5	2
<i>Enterococcus durans</i>	10,35	7,5	0,6	0
<i>Enterococcus faecium</i>	3,6	0	17,55	0
Total	211,3	177,35	46,7	2

Taula 60. Sumatori dels valors d'inhibició (VI) de cada soca làctica equina segons els diferents compostos assajats.

	Suma VI sobrenedant	Suma VI pellet	Suma VI xoc tèrmic	Suma VI pH
<i>Salmonella enterica</i>	15,25	14,65	1,75	0
<i>Pantoea</i> sp.	24,1	18,25	2,5	1
<i>Proteus vulgaricus</i>	10,75	8	0,9	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	18,9	16,1	5,85	1
<i>Escherichia coli</i>	18,35	17,25	0	0
<i>Stahylococcus aureus</i>	13,35	9,65	7,8	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	11	5,75	2,05	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	16,1	11,4	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	14,3	11	2,25	0
<i>Bacillus cereus</i>	11,3	10,3	2,25	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19,1	17,2	1	0
<i>Kocuria rhizophila</i>	38,8	37,8	20,35	0

Taula 61. Sumatori dels diferents valors d'inhibició (VI) presentats pels diferents microorganismes alteradors o patògens enfront al total de soques làctiques assajades.

Les taules 62 i 63 mostren la presència d'halos parcials respecte al total d'halos presents, en percentatges.

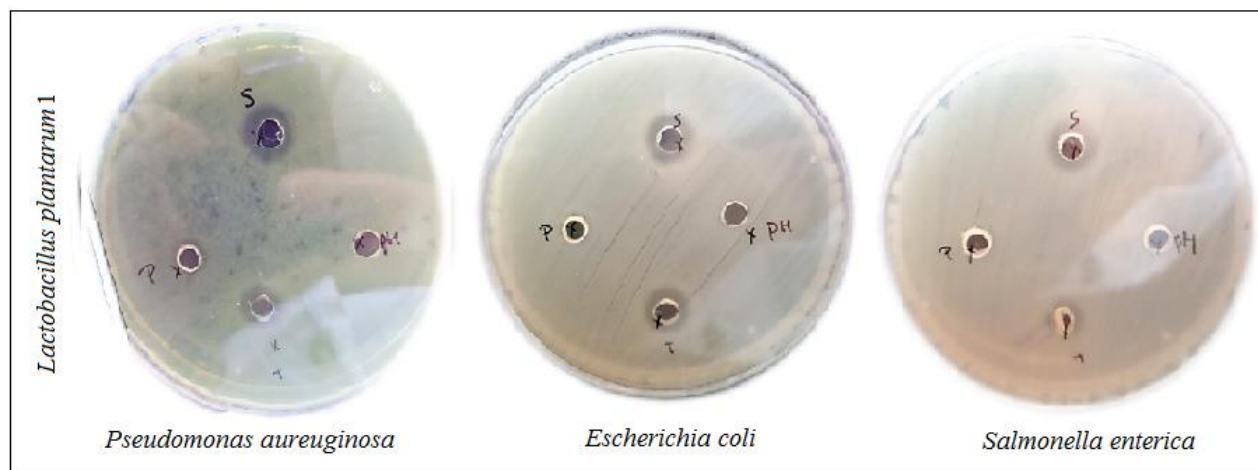
Microorganisme	Nº halos parcials/ total halos	Percentatge halos parcials
<i>Salmonella</i>	9/18	50,00
<i>Pantoea</i> sp	3/19	15,79
<i>Proteus vulgaris</i>	2/8	25,00
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8/20	40,00
<i>Escherichia coli</i>	5/17	29,41
<i>Stahylococcus aureus</i>	3/17	17,65
<i>Enterococcus faecalis</i>	2/10	20,00
<i>Listeria monocytogenes</i>	5/12	41,67
<i>Bacillus subtilis</i>	12/17	70,59
<i>Bacillus cereus</i>	7/22	31,82
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8/21	38,10
<i>Kocuria rhizophila</i>	3/20	15,00

Taula 62. Nombre d'halos parcials presentats pels diferents microorganismes alteradors o patògens respecte al total d'halos positius mostrats en l'assaig.

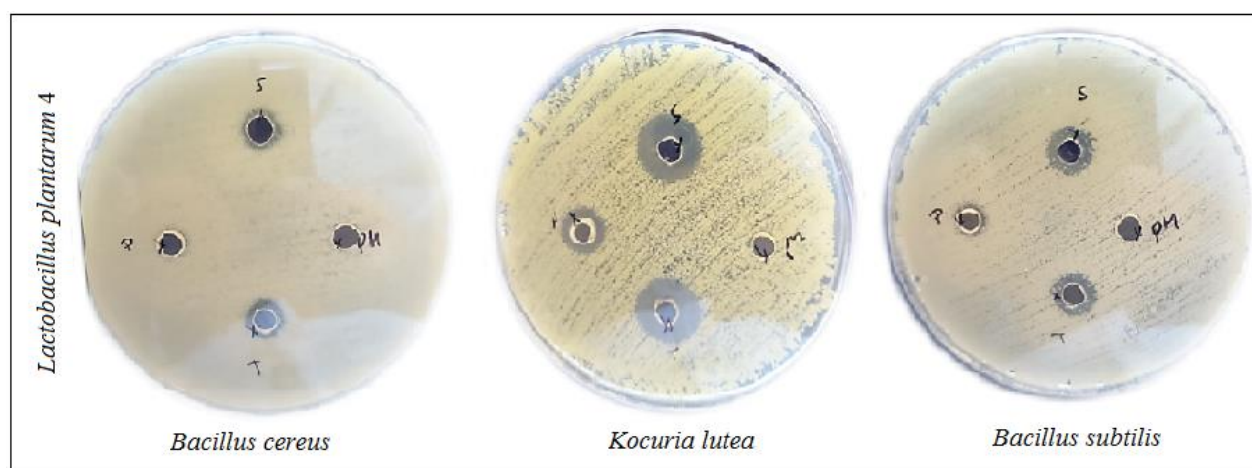
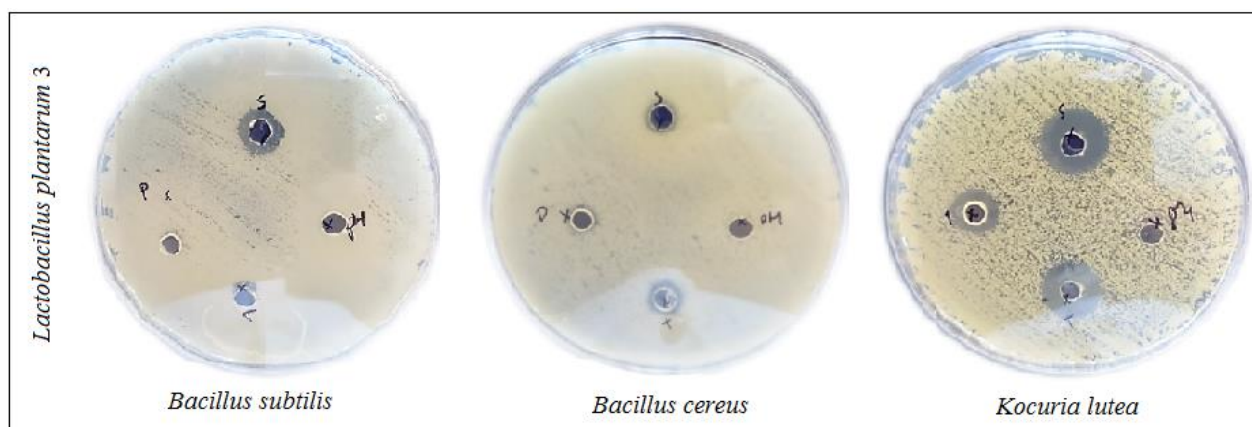
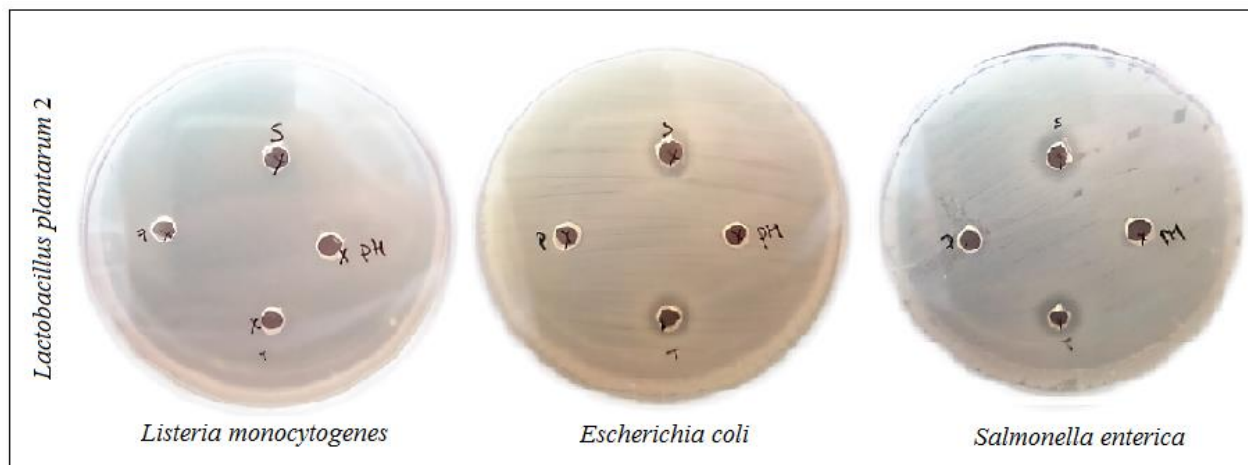
Nom de la soca BAL	Nº halos parcials/ total halos	Percentatge halos parcials
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	3/23	13,04
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	0/23	0,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	2/25	8,00
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	5/23	21,74
<i>Lactobacillus brevis</i> 2	6/7	85,71
<i>Lactobacillus plantarum</i> 4	13/26	50,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5	8/21	38,10
<i>Lactobacillus plantarum</i> 6	15/22	68,18
<i>Lactococcus lactis</i>	8/19	42,11
<i>Enterococcus durans</i>	9/16	56,25
<i>Enterococcus faecium</i>	0/6	0,00

Taula 63. Nombre d'halos parcials produïts per les diverses soques làctiques equines respecte al total d'halos positius produïts per cada soca.

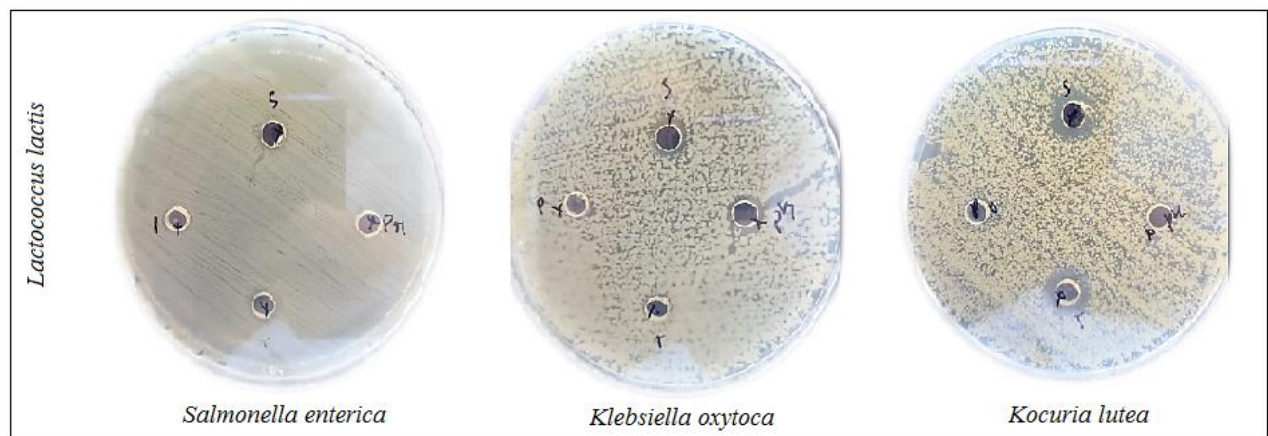
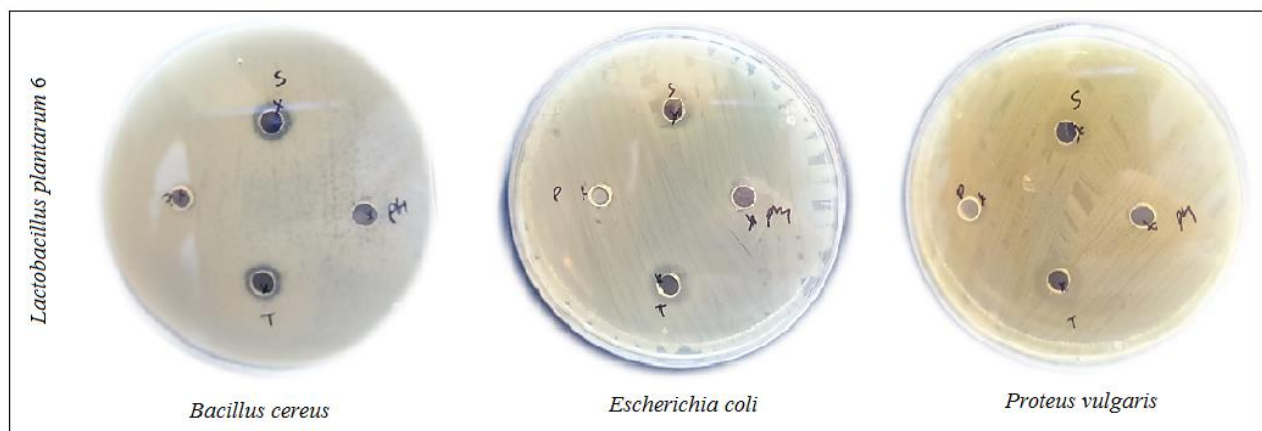
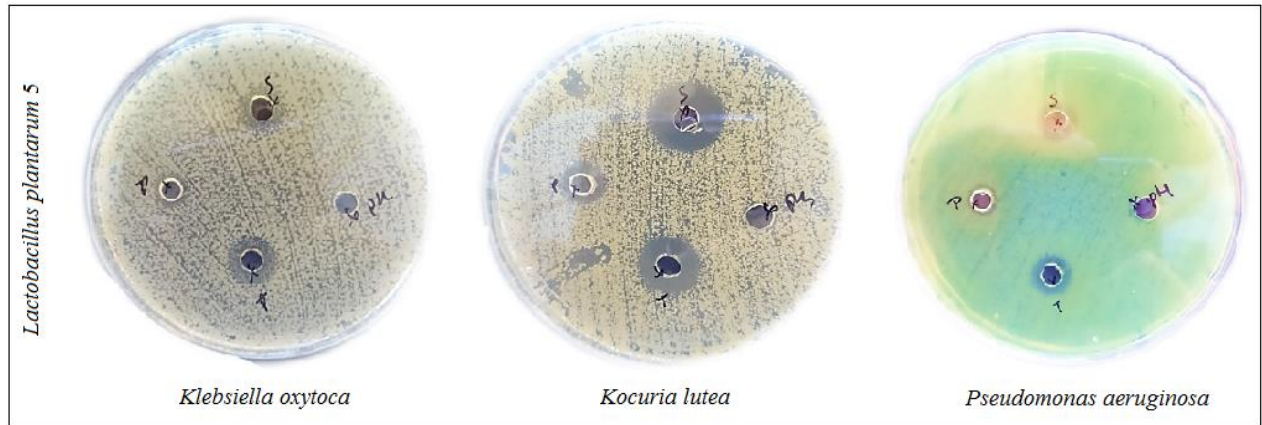
4.1.3. Resultats de l'assaig de difusió en agar. Imatges.



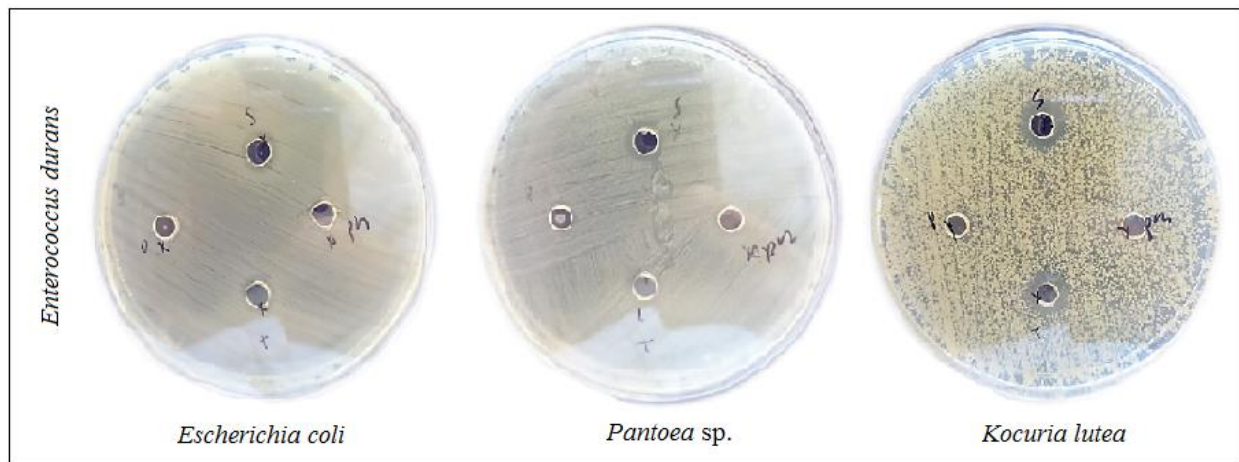
Imatge 35. Halos d'inhibició produïts de l'activitat antimicrobiana present en la soca *Lactobacillus plantarum* 1 sobre diversos microorganismes.



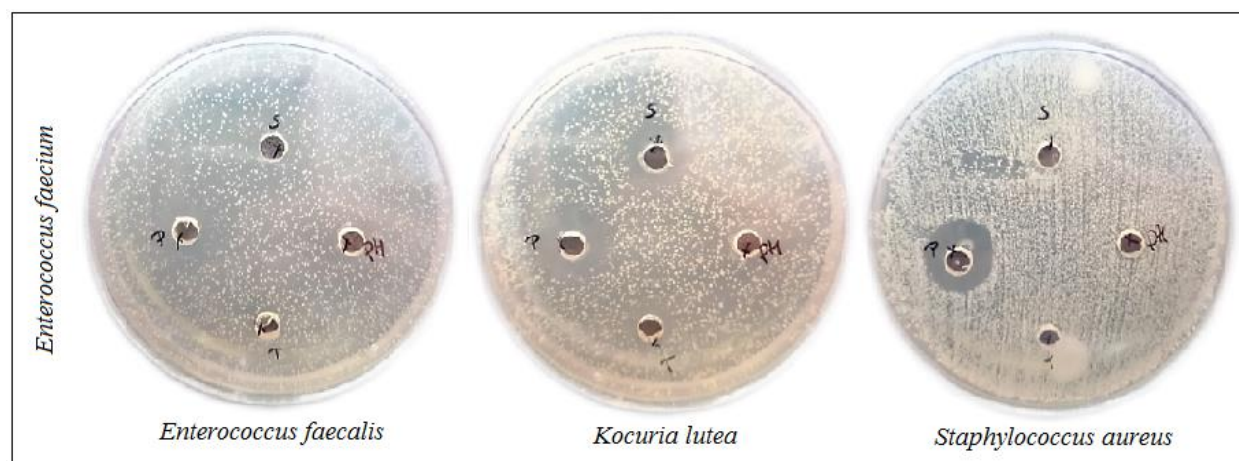
Imatges 36, 37 i 38. Halos d'inhibició producte de l'activitat antimicrobiana present en les soques *Lactobacillus plantarum* 2, 3 i 4 sobre diversos microorganismes.



Imatges 39, 40 i 41. Halos d'inhibició produïts de l'activitat antimicrobiana present en les soques *Lactobacillus plantarum* 5, *Lactobacillus plantarum* 6 i *Lactococcus lactis* sobre diversos microorganismes.



Imatge 42. Halos d'inhibició produïts de l'activitat antimicrobiana present en la soca *Enterococcus durans* sobre diversos microorganismes.



Imatge 43. Halos d'inhibició produïts de l'activitat antimicrobiana present en la soca *Enterococcus faecium* sobre diversos microorganismes.

4.1.4. Resultats de l'assaig de difusió en agar. Estadística.

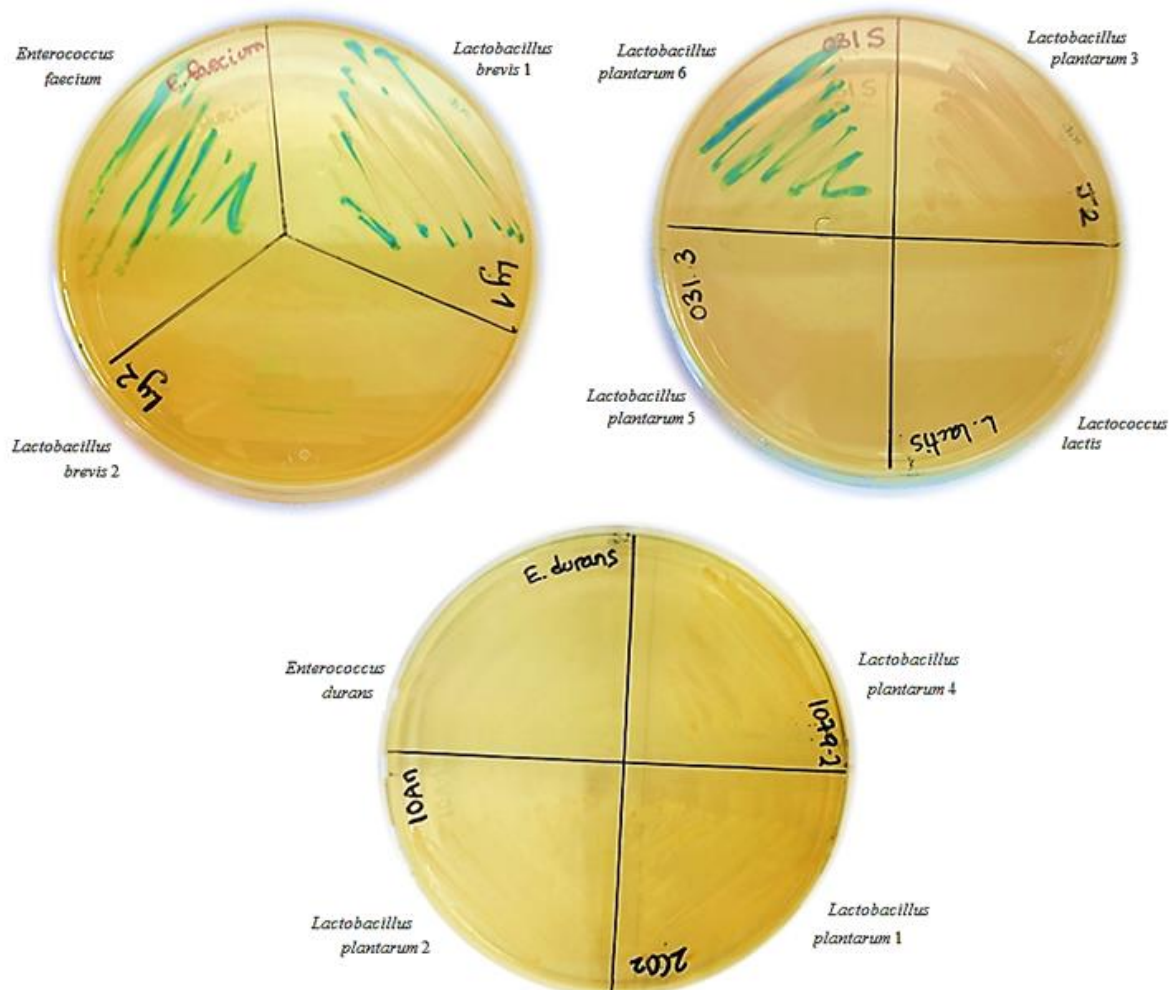
Soca làctica	p-valor sobrenedant vs. xoc tèrmic	Valor significatiu
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	0,005	Significatiu
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	0,223	
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	0,292	
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	0,019	Significatiu
<i>Lactobacillus brevis</i> 2	0,096	
<i>Lactobacillus plantarum</i> 4	0,715	
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5	0,513	
<i>Lactobacillus plantarum</i> 6	0,269	
<i>Lactococcus lactis</i>	0,675	
<i>Enterococcus durans</i>	0,093	
<i>Enterococcus faecium</i>	0,338	

Taula 64. Anàlisi estadístic de les diferències entre els resultats dels valors d'inhibició presentats pels sobrenedants i els presentats pels sobrenedants amb tractament tèrmic de 80°C durant 10 minuts en el conjunt de soques làctiques equines assajades.

4.2. Resultats de la producció de peròxid d'hidrogen

Nom de la soca	Producció de peròxid d'hidrogen
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	Positiu dèbil
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	Positiu dèbil
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	Negatiu
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	Positiu
<i>Lactobacillus brevis</i> 2	Positiu dèbil
<i>Lactobacillus plantarum</i> 4	Negatiu
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5	Negatiu
<i>Lactobacillus plantarum</i> 6	Positiu
<i>Lactococcus lactis</i>	Negatiu
<i>Enterococcus durans</i>	Negatiu
<i>Enterococcus faecium</i>	Positiu

Taula 65. Resultats de la producció de peròxid d'hidrogen per part de les soques BAL pre-seleccionades.



Imatge 44. Detall del creixement de soques BAL equines en una placa de MRS agar amb TMB i peroxidasa. Les soques que presenten color blavós són productores de peròxid d'hidrogen.

5. Capacitat de crioprotecció de la llet d'euga

5.1. Resultats de l'assaig de conservació de soques de bacteris àcid làctics equins en llet d'euga

5.1.1. Resultats de la conservació de *Lactobacillus plantarum* 3

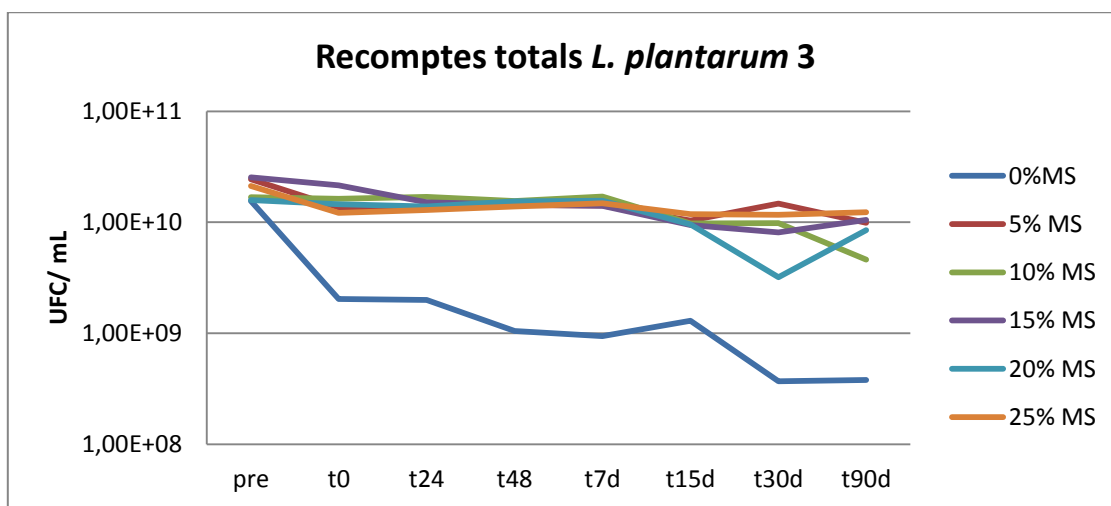


Figura 30. Evolució de la viabilitat de la soca *Lactobacillus plantarum* 3 al llarg de tres mesos d'emmagatzematge a 4°C en condicions de buit i absència de llum. La llegenda mostra la quantitat de llet d'euga en pols continguda pel medi de conservació. pre= pre liofilització. UFC/ mL= unitats formadores de colònia per mil·lilitre.

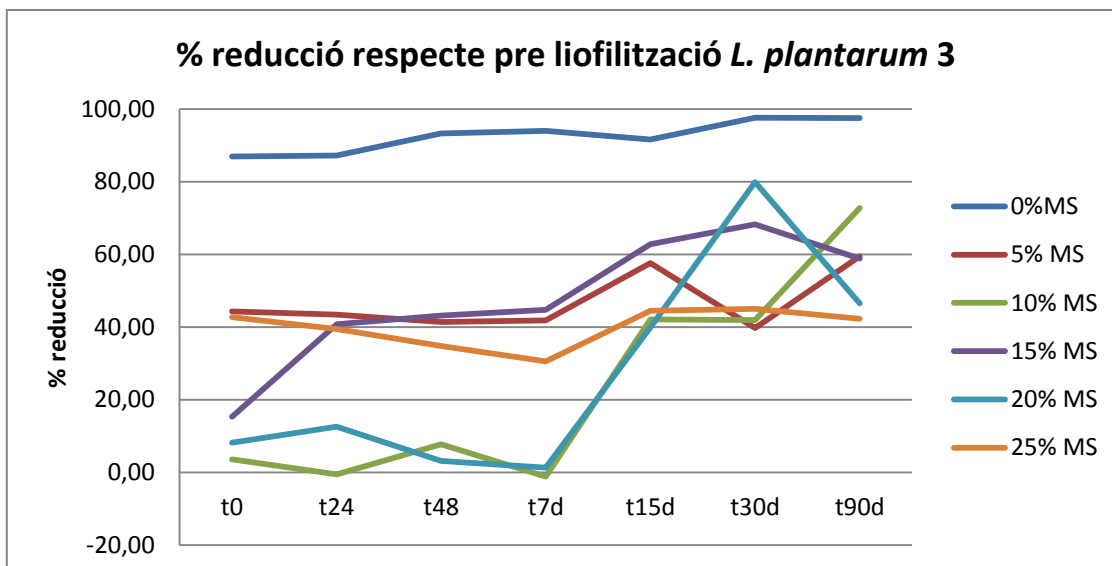


Figura 31. Percentatge de reducció de la viabilitat de *Lactobacillus plantarum* 3 respecte al valor inicial present a la llet abans del procés de liofilització i emmagatzemament. La llegenda mostra la quantitat de llet d'euga en pols continguda pel medi de conservació.

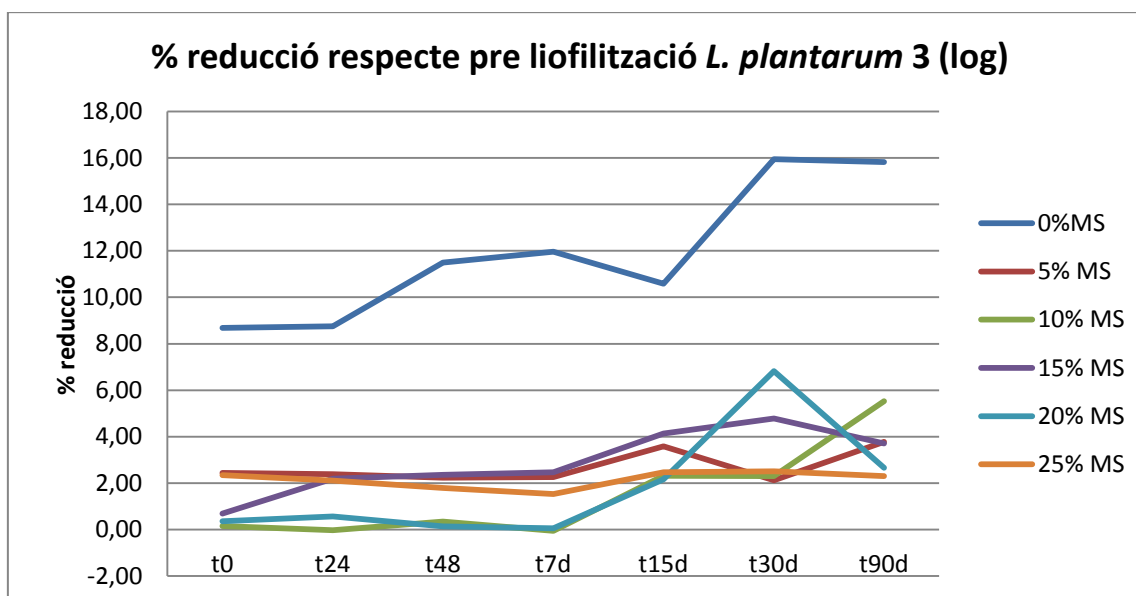


Figura 32. Percentatge de reducció de la viabilitat de *Lactobacillus plantarum* 3 respecte al valor inicial present a la llet abans del procés de liofilització i emmagatzemament, expressat en escala logarítmica. La llegenda mostra la quantitat de llet d'euga en pols continguda pel medi de conservació.

	0%MS	5%MS	10%MS	15%MS	20%MS	25%MS
pre	1,56E+10	2,44E+10	1,69E+10	2,55E+10	1,59E+10	2,13E+10
t0h	2,03E+09	1,36E+10	1,63E+10	2,16E+10	1,46E+10	1,22E+10
t24h	2,00E+09	1,38E+10	1,70E+10	1,51E+10	1,39E+10	1,29E+10
t48h	1,05E+09	1,43E+10	1,56E+10	1,45E+10	1,54E+10	1,39E+10
t7d	9,40E+08	1,42E+10	1,71E+10	1,41E+10	1,57E+10	1,48E+10
t15d	1,30E+09	1,04E+10	9,78E+09	9,48E+09	9,55E+09	1,18E+10
t30d	3,70E+08	1,47E+10	9,82E+09	8,10E+09	3,20E+09	1,17E+10
t90d	3,80E+08	9,90E+09	4,60E+09	1,05E+10	8,50E+09	1,23E+10

Taula 66. Recòmptes en unitats formadores de colònia per mil·lilitre obtinguts de preservar el liofilitzat de *Lactobacillus plantarum* 3 en diferents concentracions de llet d'euga al llarg del temps. MS= matèria seca. pre= pre liofilitzat.

% red	0%MS	5%MS	10%MS	15%MS	20%MS	25%MS
t0	86,99	44,26	3,55	15,29	8,18	42,72
t24h	87,18	43,44	-0,59	40,78	12,58	39,44
t48h	93,27	41,39	7,69	43,14	3,14	34,74
t7d	93,97	41,80	-1,18	44,71	1,26	30,52
t15d	91,67	57,58	42,13	62,82	39,94	44,46
t30d	97,63	39,75	41,89	68,24	79,87	44,98
t90d	97,56	59,43	72,78	58,82	46,54	42,25

Taula 67. Percentatge de reducció de la viabilitat respecte a la pre liofilització de la soca *Lactobacillus plantarum* 3 al llarg de tres mesos, expressada en valors absoluts. MS= matèria seca.

log	0%MS	5%MS	10%MS	15%MS	20%MS	25%MS
pre	10,19	10,39	10,23	10,41	10,20	10,33
t0h	9,31	10,13	10,21	10,33	10,16	10,09
t24h	9,30	10,14	10,23	10,18	10,14	10,11
t48h	9,02	10,16	10,19	10,16	10,19	10,14
t7d	8,97	10,15	10,23	10,15	10,20	10,17
t15d	9,11	10,01	9,99	9,98	9,98	10,07
t30di	8,57	10,17	9,99	9,91	9,51	10,07
t90d	8,58	10,00	9,66	10,02	9,93	10,09

Taula 68. Recòmptes de la Taula 66 expressats en logaritme. MS= matèria seca. pre= pre liofilitzat.

% red log	0%	5%	10%	15%	20%	25%
t0	8,69	2,44	0,15	0,69	0,36	2,34
t24h	8,75	2,38	-0,03	2,19	0,57	2,11
t48h	11,50	2,23	0,34	2,36	0,14	1,79
t7d	11,97	2,26	-0,05	2,47	0,05	1,53
t15d	10,59	3,59	2,32	4,13	2,17	2,47
t30d	15,94	2,12	2,31	4,79	6,83	2,51
t90d	15,83	3,77	5,53	3,70	2,67	2,31

Taula 69. Percentatge de reducció de la viabilitat respecte a la pre liofilització de la soca *Lactobacillus plantarum* 3 al llarg de tres mesos, expressada en logaritmes. MS= matèria seca.

5.1.2. Resultats de la conservació de *Lactobacillus plantarum* 2

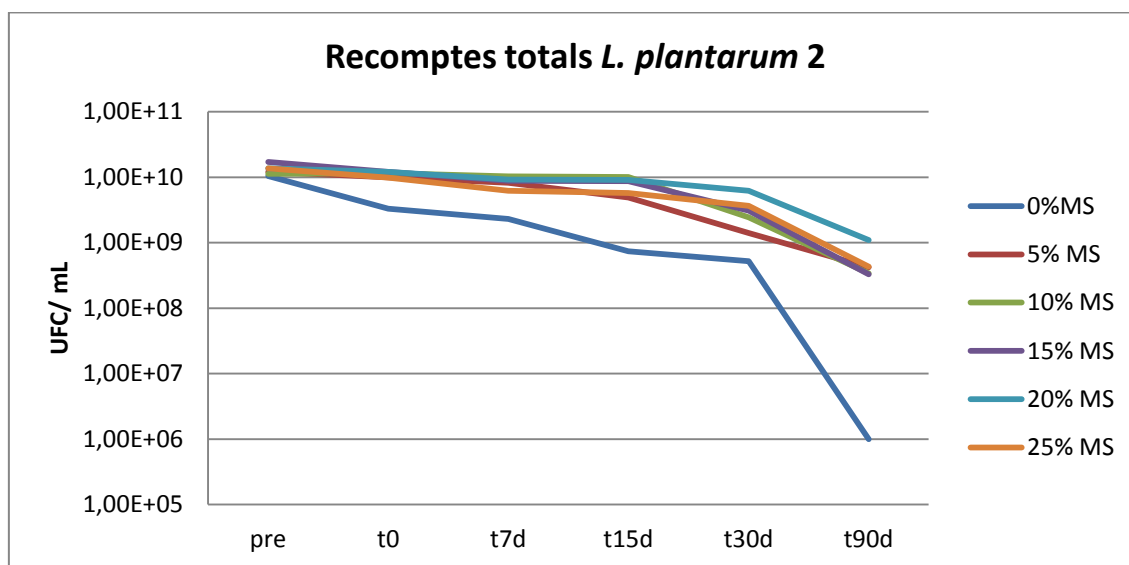


Figura 33. Evolució de la viabilitat de la soca *Lactobacillus plantarum* 2 al llarg de tres mesos d'emmagatzematge a temperatura ambient en condicions de buit i absència de llum. La llegenda mostra la quantitat de llet d'euga en pols continguda pel medi de conservació. pre= pre liofilització. UFC/ mL= unitats formadores de colònia per mil·lilitre.

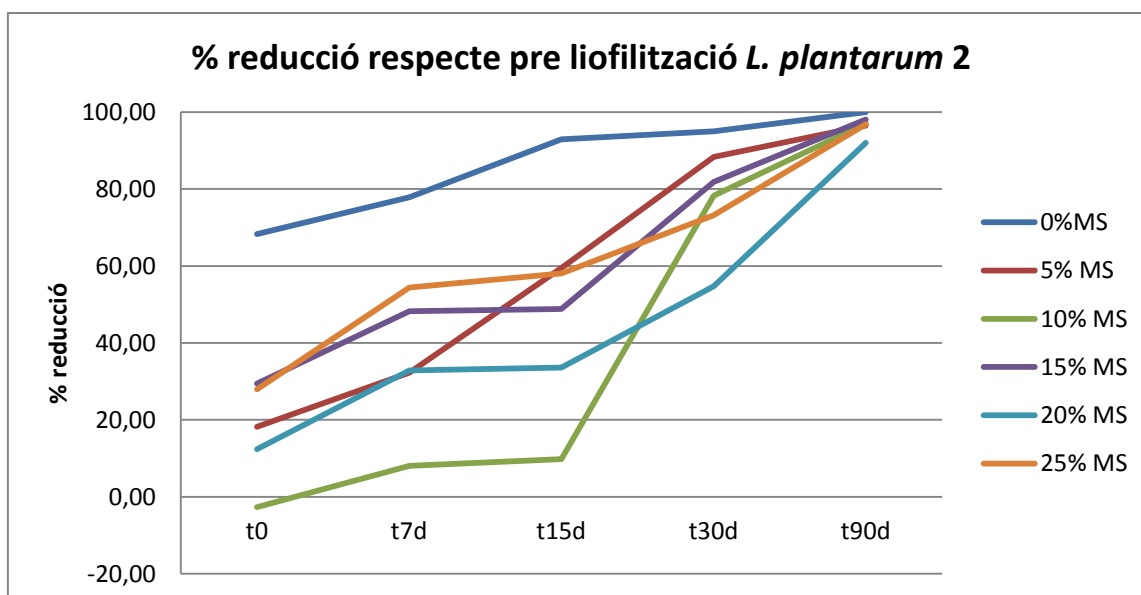


Figura 34. Percentatge de reducció de la viabilitat de *Lactobacillus plantarum 2* respecte al valor inicial present a la llet abans del procés de liofilització i emmagatzemament. La llegenda mostra la quantitat de llet d’euga en pols continguda pel medi de conservació.

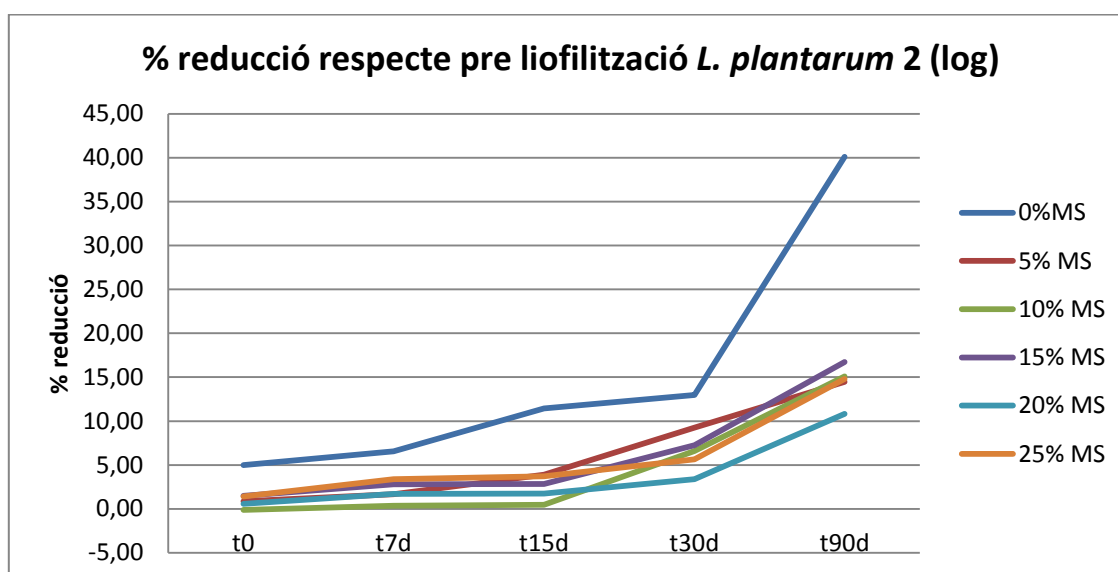


Figura 35. Percentatge de reducció de la viabilitat de *Lactobacillus plantarum 2* respecte al valor inicial present a la llet abans del procés de liofilització i emmagatzemament, expressat en escala logarítmica. La llegenda mostra la quantitat de llet d’euga en pols continguda pel medi de conservació.

	0%MS	5%MS	10%MS	15%MS	20%MS	25%MS
pre	1,04E+10	1,21E+10	1,12E+10	1,70E+10	1,37E+10	1,36E+10
t0	3,30E+09	9,90E+09	1,15E+10	1,20E+10	1,20E+10	9,80E+09
t7d	2,30E+09	8,20E+09	1,03E+10	8,80E+09	9,20E+09	6,20E+09
t15d	7,40E+08	4,90E+09	1,01E+10	8,70E+09	9,10E+09	5,70E+09
t30d	5,20E+08	1,41E+09	2,43E+09	3,08E+09	6,20E+09	3,64E+09
t90d	1,00E+06	4,20E+08	3,40E+08	3,29E+08	1,10E+09	4,30E+08

Taula 70. Recomptes en unitats formadores de colònia per mil·lilitre obtinguts de preservar el liofilitzat de *Lactobacillus plantarum* 2 en diferents concentracions de llet d'euga al llarg del temps. MS= matèria seca. pre= pre liofilitzat.

% red	0%MS	5%MS	10%MS	15%MS	20%MS	25%MS
t0	68,27	18,18	-2,68	29,41	12,41	27,94
t7d	77,88	32,23	8,04	48,24	32,85	54,41
t15d	92,88	59,50	9,82	48,82	33,58	58,09
t30d	95,00	88,35	78,30	81,88	54,74	73,24
t90d	99,99	96,53	96,96	98,06	91,97	96,84

Taula 71. Percentatge de reducció de la viabilitat respecte a la pre liofilització de la soca *Lactobacillus plantarum* 2 al llarg de tres mesos, expressada en valors absoluts. MS= matèria seca.

log	0%MS	5%MS	10%MS	15%MS	20%MS	25%MS
pre	10,02	10,08	10,05	10,23	10,14	10,13
t0	9,52	10,00	10,06	10,08	10,08	9,99
t7d	9,36	9,91	10,01	9,94	9,96	9,79
t15d	8,87	9,69	10,00	9,94	9,96	9,76
t30d	8,72	9,15	9,39	9,49	9,79	9,56
t90d	6,00	8,62	8,53	8,52	9,04	8,63

Taula 72. Recomptes de la Taula 70 expressats en logaritme. MS= matèria seca. Pre= pre liofilitzat.

% red log	0%MS	5%MS	10%MS	15%MS	20%MS	25%MS
t0	4,98	0,86	-0,11	1,48	0,57	1,40
t7d	6,54	1,68	0,36	2,80	1,71	3,37
t15d	11,46	3,89	0,45	2,84	1,75	3,73
t30d	12,99	9,26	6,60	7,25	3,40	5,65
t90d	40,10	14,48	15,10	16,75	10,81	14,80

Taula 73. Percentatge de reducció de la viabilitat respecte a la pre liofilització de la soca *Lactobacillus plantarum* 2 al llarg de tres mesos, expressada en logaritmes. MS= matèria seca.

5.1.3. Resultats de la conservació de *Lactobacillus brevis* 1

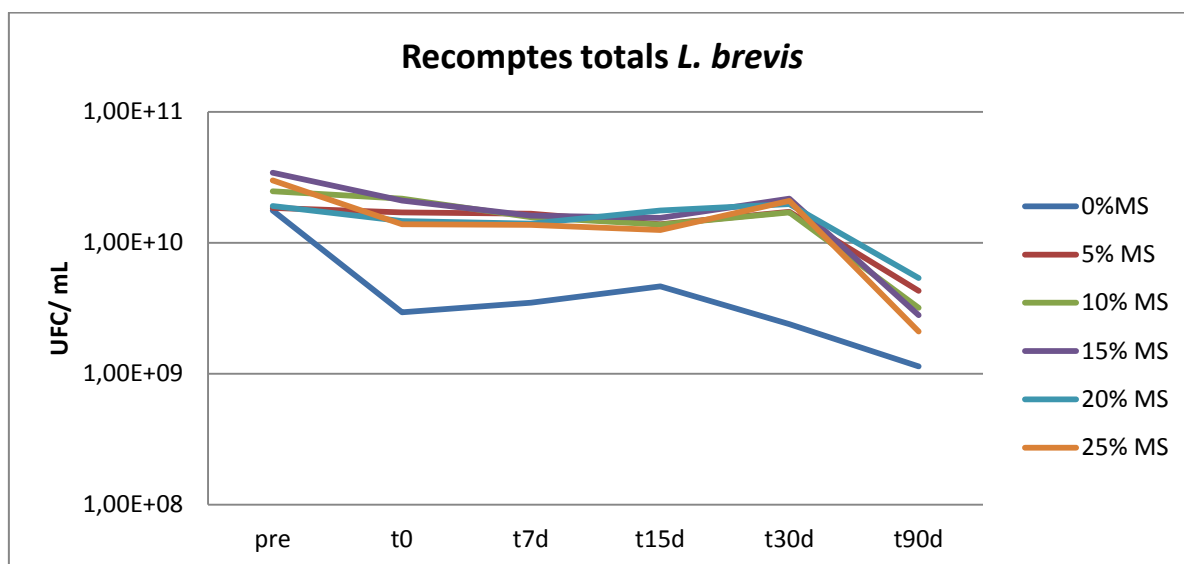


Figura 36. Evolució de la viabilitat de la soca *Lactobacillus brevis* al llarg de tres mesos d'emmagatzematge a 4°C en condicions de buit i absència de llum. La llegenda mostra la quantitat de llet d'euga en pols continguda pel medi de conservació. pre= pre liofilització. UFC/ mL= unitats formadores de colònia per mil·lilitre.

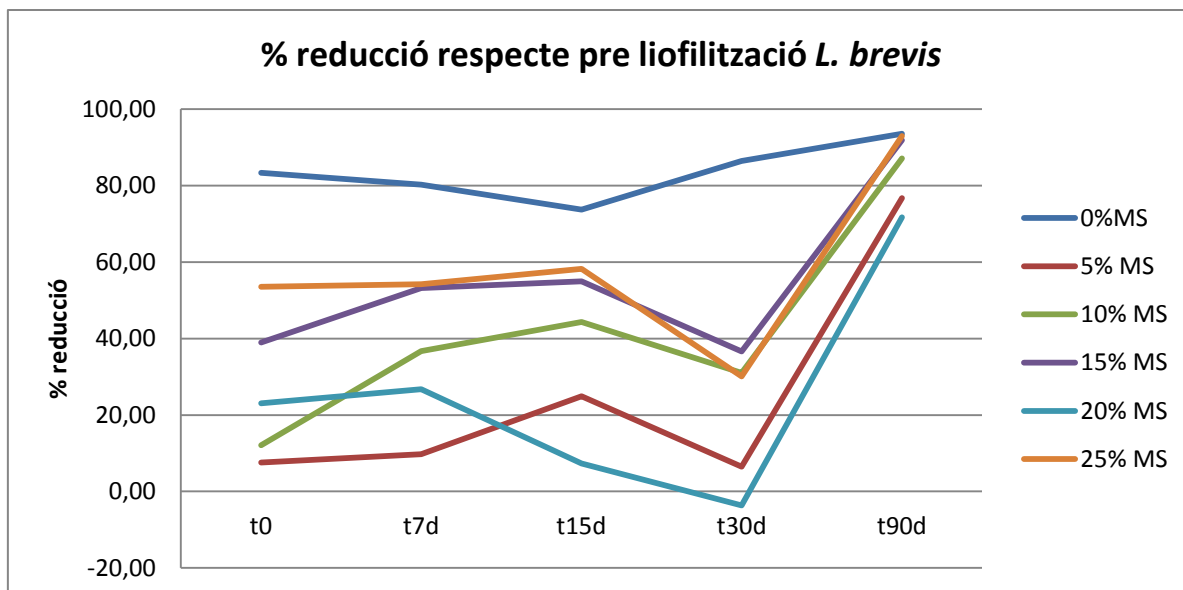


Figura 37. Percentatge de reducció de la viabilitat de *Lactobacillus brevis* 1 respecte al valor inicial present a la llet abans del procés de liofilització i emmagatzemament. La llegenda mostra la quantitat de llet d'euga en pols continguda pel medi de conservació.

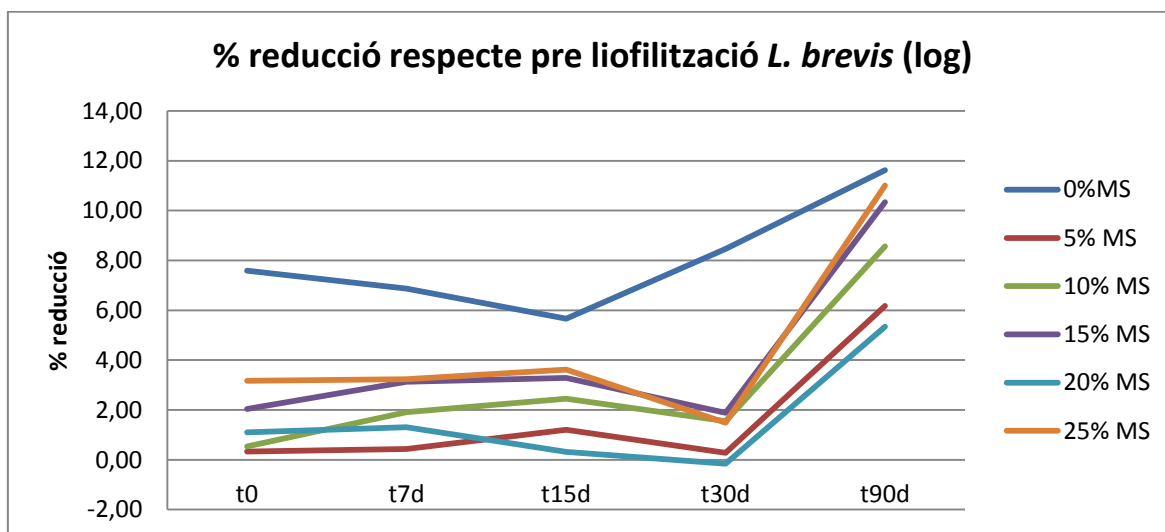


Figura 38. Percentatge de reducció de la viabilitat de *Lactobacillus brevis* 1 respecte al valor inicial present a la llet abans del procés de liofilització i emmagatzemament, expressat en escala logarítmica. La llegenda mostra la quantitat de llet d'euga en pols continguda pel medi de conservació.

	0%MS	5%MS	10%MS	15%MS	20%MS	25%MS
pre	1,77E+10	1,85E+10	2,48E+10	3,44E+10	1,91E+10	2,99E+10
t0	2,95E+09	1,71E+10	2,18E+10	2,10E+10	1,47E+10	1,39E+10
t7d	3,50E+09	1,67E+10	1,57E+10	1,61E+10	1,40E+10	1,37E+10
t15d	4,66E+09	1,39E+10	1,38E+10	1,55E+10	1,77E+10	1,25E+10
t30d	2,40E+09	1,73E+10	1,71E+10	2,18E+10	1,98E+10	2,09E+10
t90d	1,14E+09	4,30E+09	3,19E+09	2,80E+09	5,40E+09	2,10E+09

Taula 74. Recòmptes en unitats formadores de colònia per mil·lilitre obtinguts de preservar el liofilitzat de *Lactobacillus brevis* 1 en diferents concentracions de llet d'euga al llarg del temps. MS= matèria seca. pre= pre liofilitzat.

% red	0%MS	5%MS	10%MS	15%MS	20%MS	25%MS
t0	83,33	7,57	12,10	38,95	23,04	53,51
t7d	80,23	9,73	36,69	53,20	26,70	54,18
t15d	73,67	24,86	44,35	54,94	7,33	58,19
t30d	86,44	6,49	31,05	36,63	-3,66	30,10
t90d	93,56	76,76	87,14	91,86	71,73	92,98

Taula 75. Percentatge de reducció de la viabilitat respecte a la pre liofilització de la soca *Lactobacillus brevis* 1 al llarg de tres mesos, expressada en valors absoluts. MS= matèria seca.

log	0%MS	5%MS	10%MS	15%MS	20%MS	25%MS
pre	10,25	10,27	10,39	10,54	10,28	10,48
t0	9,47	10,23	10,34	10,32	10,17	10,14
t7d	9,54	10,22	10,20	10,21	10,15	10,14
t15d	9,67	10,14	10,14	10,19	10,25	10,10
t30d	9,38	10,24	10,23	10,34	10,30	10,32
t90d	9,06	9,63	9,50	9,45	9,73	9,32

Taula 76. Recòmptes de la Taula 74 expressats en logaritme. MS= matèria seca. pre= pre liofilitzat.

% red log	0%	5%	10%	15%	20%	25%
t0	7,59	0,33	0,54	2,03	1,11	3,18
t7d	6,87	0,43	1,91	3,13	1,31	3,24
t15d	5,66	1,21	2,45	3,29	0,32	3,62
t30d	8,47	0,28	1,55	1,88	-0,15	1,48
t90d	11,62	6,17	8,57	10,34	5,34	11,01

Taula 77. Percentatge de reducció de la viabilitat respecte a la pre liofilització de la soca *Lactobacillus brevis* 1 al llarg de tres mesos, expressada en logaritmes. MS= matèria seca.

5.1.4. Resultats de la conservació de *Lactococcus lactis*

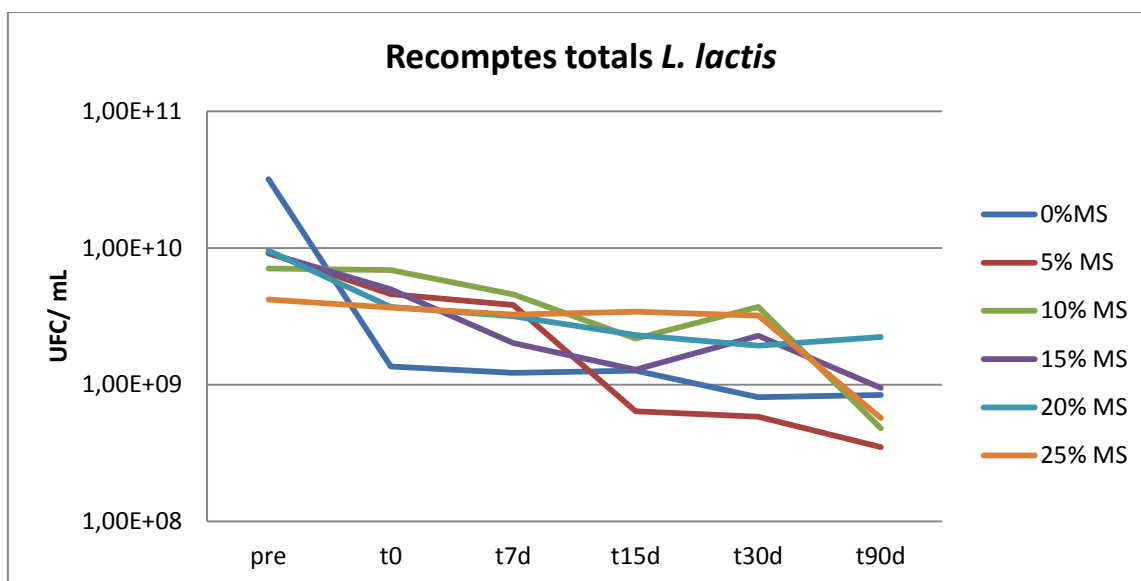


Figura 39. Evolució de la viabilitat de la soca *Lactococcus lactis* al llarg de tres mesos d'emmagatzematge a 4°C en condicions de buit i absència de llum. La llegenda mostra la quantitat de llet d'euga en pols continguda pel medi de conservació. pre= pre liofilització. UFC/ mL= unitats formadores de colònia per mil·lilitre.

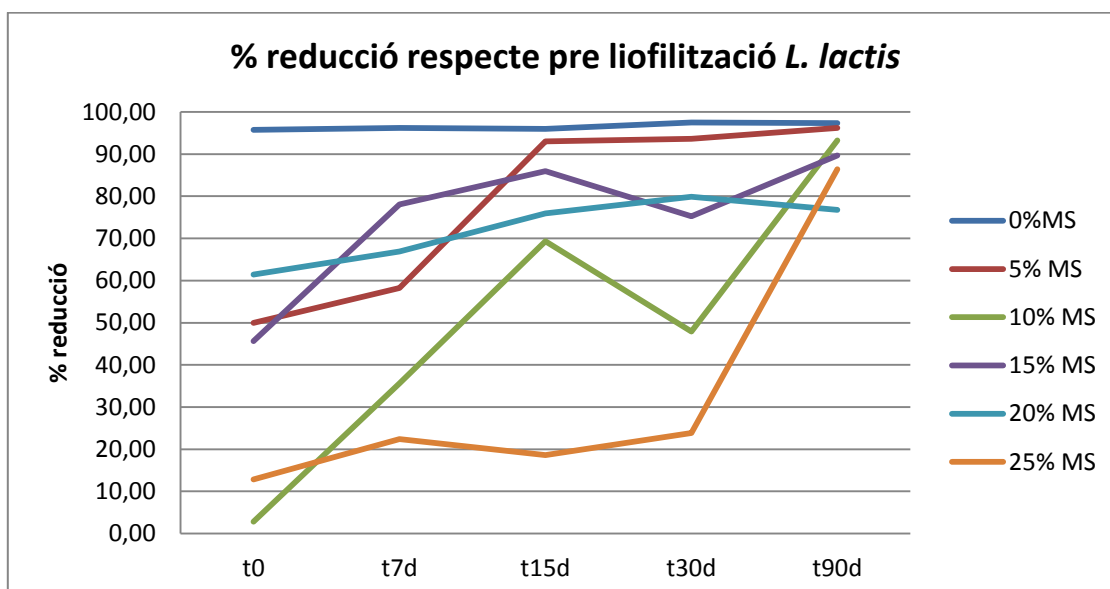


Figura 40. Percentatge de reducció de la viabilitat de *Lactococcus lactis* respecte al valor inicial present a la llet abans del procés de liofilització i emmagatzemament. La llegenda mostra la quantitat de llet d'euga en pols continguda pel medi de conservació.

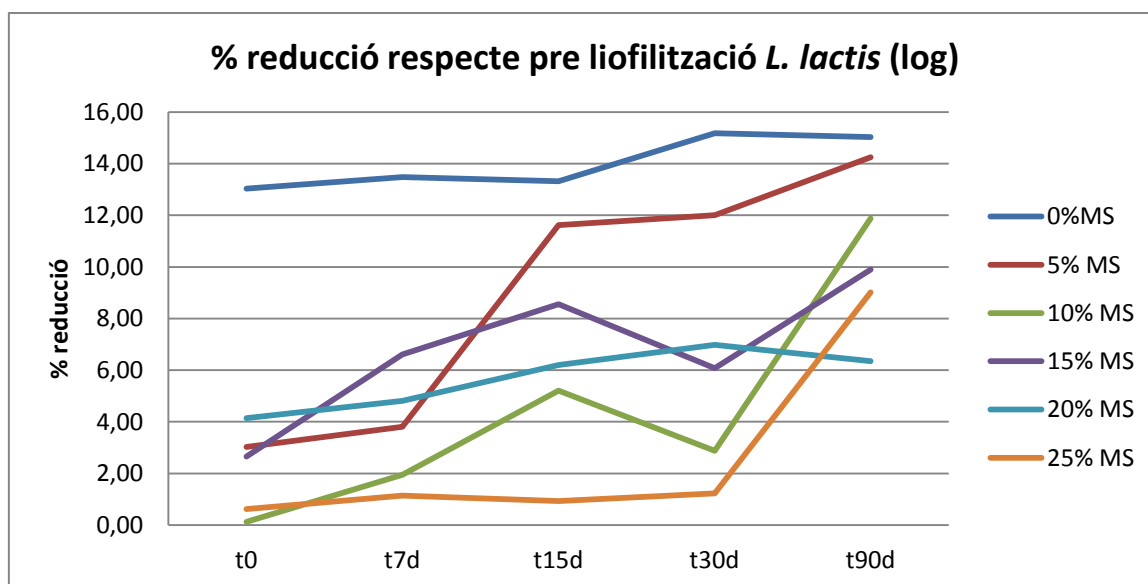


Figura 41. Percentatge de reducció de la viabilitat de *Lactococcus lactis* respecte al valor inicial present a la llet abans del procés de liofilització i emmagatzemament, expressat en escala logarítmica. La llegenda mostra la quantitat de llet d'euga en pols continguda pel medi de conservació.

	0%MS	5%MS	10%MS	15%MS	20%MS	25%MS
pre	3,18E+10	9,20E+09	7,10E+09	9,20E+09	9,60E+09	4,20E+09
t0	1,36E+09	4,60E+09	6,90E+09	5,00E+09	3,70E+09	3,66E+09
t7d	1,22E+09	3,84E+09	4,57E+09	2,02E+09	3,18E+09	3,26E+09
t15d	1,27E+09	6,40E+08	2,18E+09	1,29E+09	2,31E+09	3,42E+09
t30d	8,10E+08	5,85E+08	3,70E+09	2,28E+09	1,93E+09	3,20E+09
t90d	8,40E+08	3,50E+08	4,80E+08	9,50E+08	2,23E+09	5,70E+08

Taula 78. Recòmptes en unitats formadores de colònia per mil·lilitre obtinguts de preservar el liofilitzat de *Lactococcus lactis* en diferents concentracions de llet d'euga al llarg del temps. MS= matèria seca. pre= pre liofilitzat.

% red	0%MS	5%MS	10%MS	15%MS	20%MS	25%MS
t0	95,72	50,00	2,82	45,65	61,46	12,86
t7d	96,16	58,26	35,63	78,04	66,88	22,38
t15d	96,01	93,04	69,30	85,98	75,94	18,57
t30d	97,45	93,64	47,89	75,22	79,90	23,81
t90d	97,36	96,20	93,24	89,67	76,77	86,43

Taula 79. Percentatge de reducció de la viabilitat respecte a la pre liofilització de la soca *Lactococcus lactis* al llarg de tres mesos, expressada en valors absoluts. MS= matèria seca.

log	0%MS	5%MS	10%MS	15%MS	20%MS	25%MS
pre	10,50	9,96	9,85	9,96	9,98	9,62
t0	9,13	9,66	9,84	9,70	9,57	9,56
t7d	9,09	9,58	9,66	9,31	9,50	9,51
t15d	9,10	8,81	9,34	9,11	9,36	9,53
t30d	8,91	8,77	9,57	9,36	9,29	9,51
t90d	8,92	8,54	8,68	8,98	9,35	8,76

Taula 80. Recòmptes de la Taula 78 expressats en logaritme. MS= matèria seca. pre= pre liofilitzat.

% red log	0%	5%	10%	15%	20%	25%
t0	13,03	3,02	0,13	2,66	4,15	0,62
t7dies	13,48	3,81	1,94	6,61	4,81	1,14
t15dies	13,32	11,62	5,21	8,56	6,20	0,93
t30dies	15,18	12,01	2,87	6,08	6,98	1,23
t90 dies	15,03	14,25	11,88	9,90	6,35	9,01

Taula 81. Percentatge de reducció de la viabilitat respecte a la pre liofilització de la soca *Lactococcus lactis* al llarg de tres mesos, expressada en logaritmes. MS= matèria seca.

5.1.5. Resultats estadístics de l'assaig de conservació de soques BAL en llet d'euga

Nom de la soca	Dades comparades	P- valor ($\alpha=0,05$)				
		0% vs 5%MS	0% vs 10%MS	0% vs 15%MS	0% vs 20%MS	0% vs 25%MS
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	% reducció (v. abs)	0,00001*	0,0004*	0,0002*	0,0007*	0,000001*
	%reducció (log)	0,0002*	0,00001*	0,00003*	0,00001*	0,0001*
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	% reducció (v. abs)	0,05	0,04*	0,03*	0,01*	0,02*
	%reducció (log)	0,09	0,04*	0,07	0,06	0,08
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	% reducció (v. abs)	0,008*	0,02*	0,03*	0,006*	0,05
	%reducció (log)	0,001*	0,004*	0,02*	0,0004*	0,03*
<i>Lactococcus lactis</i>	% reducció (v. abs)	0,000002*	0,000001*	0,0000001*	0,000000001*	0,00000003*
	%reducció (log)	0,06	0,006*	0,003*	0,00001*	0,001*

Taula 82. Resum dels p-valors obtinguts de la comparació de la capacitat de protecció de les diferents concentracions de llet d'euga amb el grup control sense llet. v. abs= valors absoluts.

*valors estadísticament significatius.

5.2. Resultats de la conservació de la viabilitat de tres soques de *Lactobacillus plantarum* durant la liofilització amb llet d'euga comparat amb la llet de vaca

<i>Lactobacillus plantarum</i> 1			
Concentració MS	UFC/mL Pre liofilització	UFC/mL Post liofilització	Pèrdua (UFC/ mL)
5% E	3,80E+09	2,90E+08	1,31E+03
10% E	6,50E+09	1,64E+09	3,96E+02
15% E	5,40E+09	1,59E+09	3,40E+02
20% E	3,40E+09	1,30E+09	2,62E+02
25% E	7,10E+09	1,45E+09	4,90E+02
5% V	3,60E+09	8,00E+08	4,50E+02
10% V	3,70E+09	8,10E+08	4,57E+02
15% V	3,30E+09	1,29E+09	2,56E+02
20% V	2,40E+09	1,20E+09	2,00E+02
25% V	4,00E+09	9,50E+08	4,21E+02

Taula 83. Recomptes totals de la soca *Lactobacillus plantarum* 1 en vials pre i post liofilització, així com la pèrdua de viabilitat corresponent, organitzats segons les concentracions i el crioprotectors emprat. UFC/mL= Unitats formadores de colònia per mil·lilitre. E= llet d'euga. V= llet de vaca. MS= matèria seca.

<i>Lactobacillus plantarum</i> 2			
Concentració MS	UFC/mL Pre liofilització	UFC/mL Post liofilització	Pèrdua (UFC/ mL)
5% E	4,10E+09	7,80E+08	5,26E+02
10% E	4,90E+09	1,01E+09	4,85E+02
15% E	4,50E+09	1,17E+09	3,85E+02
20% E	5,40E+09	9,90E+08	5,45E+02
25% E	3,30E+09	9,70E+08	3,40E+02
5% V	4,80E+09	1,29E+09	3,72E+02
10% V	6,50E+09	1,14E+09	5,70E+02
15% V	4,50E+09	1,23E+09	3,66E+02
20% V	5,20E+09	1,03E+09	5,05E+02
25% V	3,80E+09	1,19E+09	3,19E+02

Taula 84. Recomptes totals de la soca *Lactobacillus plantarum* 2 en vials pre i post liofilització, així com la pèrdua de viabilitat corresponent, organitzats segons les concentracions i el crioprotectors emprat. UFC/mL= Unitats formadores de colònia per mil·lilitre. E= llet d'euga. V= llet de vaca. MS= matèria seca.

Lactobacillus plantarum 3

Concentració MS	UFC/mL Pre liofilització	UFC/mL Post liofilització	Pèrdua (UFC/ mL)
5% E	2,10E+09	9,80E+08	2,14E+02
10% E	2,60E+09	1,36E+09	1,91E+02
15% E	2,20E+09	7,40E+08	2,97E+02
20% E	4,50E+09	1,16E+09	3,88E+02
25% E	2,80E+09	1,02E+09	2,75E+02
5% V	3,00E+09	9,40E+08	3,19E+02
10% V	2,80E+09	9,00E+08	3,11E+02
15% V	4,00E+08	7,60E+08	5,26E+01
20% V	2,10E+09	1,02E+09	2,06E+02
25% V	3,00E+09	1,03E+09	2,91E+02

Taula 85. Recòmptes totals de la soca *Lactobacillus plantarum 3* en vials pre i post liofilització, així com la pèrdua de viabilitat corresponent, organitzats segons les concentracions i el crioprotectors emprat. UFC/mL= Unitats formadores de colònia per mil·lilitre. E= llet d'euga. V= llet de vaca. MS= matèria seca.

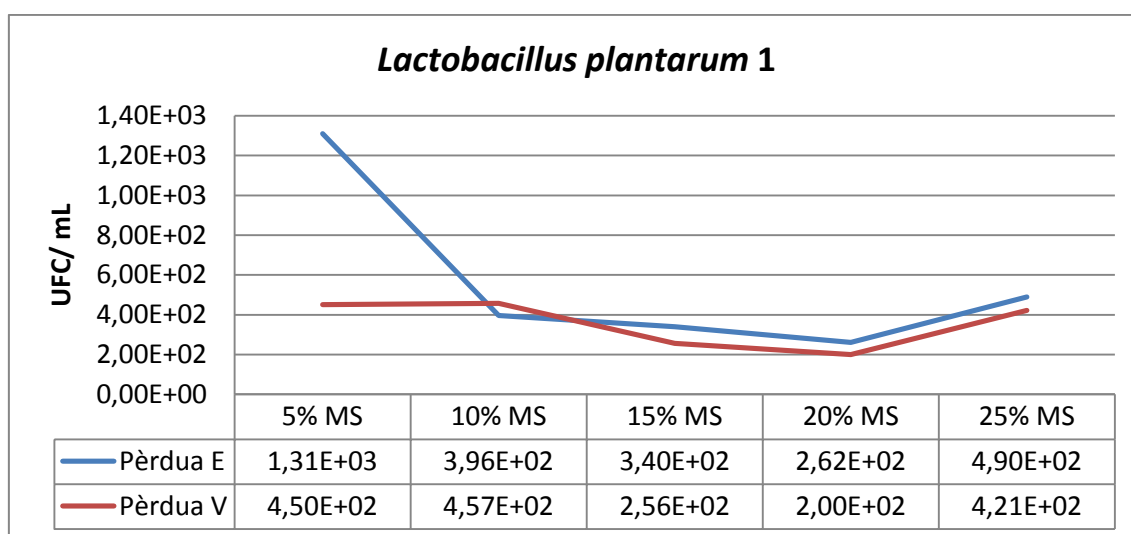


Figura 42. Comparativa entre la capacitat de supervivència al procés de liofilització usant com a crioprotectors llet d'euga i llet de vaca, per a la soca *Lactobacillus plantarum 1*. Els valors s'expressen en unitats formadores de colònia per mil·lilitre (UFC/mL), i corresponen a la pèrdua de viabilitat deguda a la liofilització. E= llet d'euga. V= llet de vaca. % MS= % de llet en pols (matèria seca).

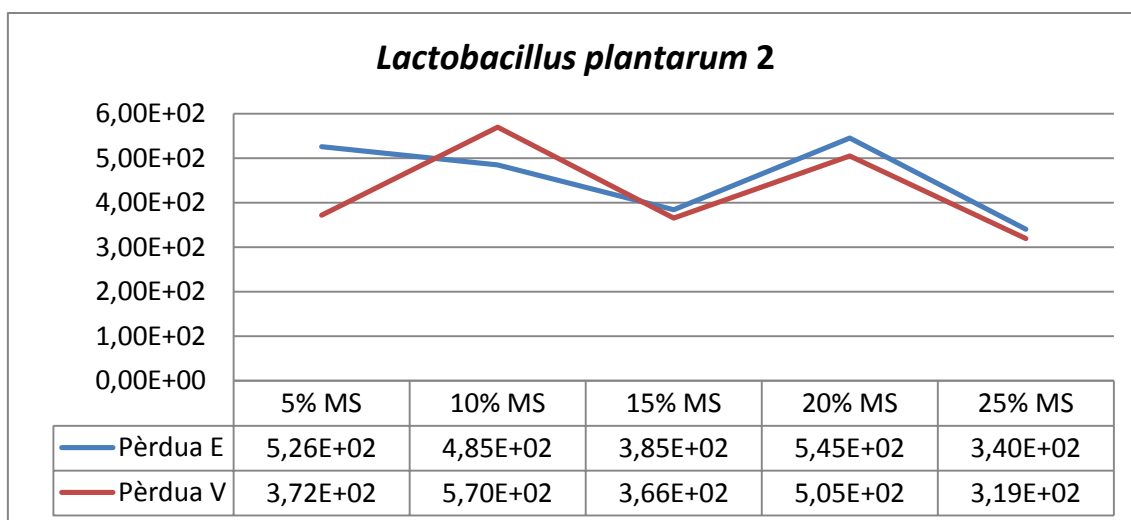


Figura 43. Comparativa entre la capacitat de supervivència al procés de liofilització usant com a crioprotectors llet d’euga i llet de vaca, per a la soca *Lactobacillus plantarum 2*. Els valors s’expressen en unitats formadores de colònia per mil·lilitre (UFC/mL), i corresponen a la pèrdua de viabilitat deguda a la liofilització. E= llet d’euga. V= llet de vaca. % MS= % de llet en pols (matèria seca).

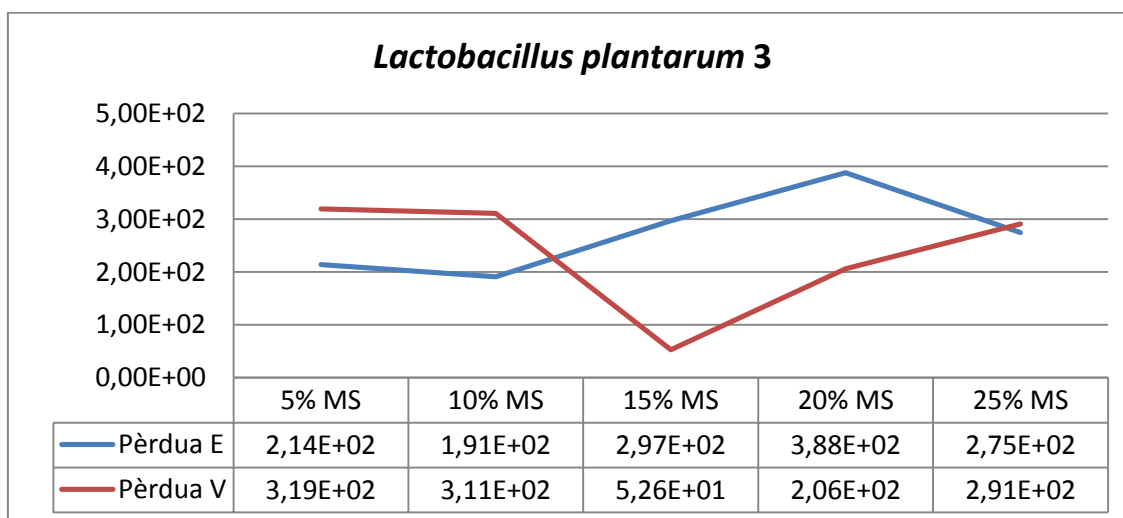


Figura 44. Comparativa entre la capacitat de supervivència al procés de liofilització usant com a crioprotectors llet d’euga i llet de vaca, per a la soca *Lactobacillus plantarum 3*. Els valors s’expressen en unitats formadores de colònia per mil·lilitre (UFC/mL), i corresponen a la pèrdua de viabilitat deguda a la liofilització. E= llet d’euga. V= llet de vaca. % MS= % de llet en pols (matèria seca).

P-valor llet d'euga vs llet de vaca		
Soca	P-valor val abs ($\alpha=0,05$)	P-valor log ($\alpha=0,05$)
<i>Lactobacillus plantarum 1</i>	0,290	0,18
<i>Lactobacillus plantarum 2</i>	0,477	0,41
<i>Lactobacillus plantarum 3</i>	0,646	0,53

Taula 86. Resum dels p-valors obtinguts de la comparació de la capacitat de crioprotecció per part de les diferents concentracions de llet d'euga i de llet de vaca, per a *Lactobacillus plantarum* 1, 2 i 3. α = nivells de significació. Val abs= valors absoluts.

5.3. Resultats de la conservació de la viabilitat de *Lactobacillus plantarum 2* durant 90 dies amb llet d'euga en comparació a la llet de vaca

<i>L. plantarum 2</i> vaca 15%MS	Recompte en valors absoluts	Recompte en log	% reducció en valors absoluts	% reducció en log
pre	1,66E+09	9,22		
t0d	7,20E+08	8,86	56,63	3,93
t7d	4,10E+08	8,61	75,30	6,59
t15d	5,48E+08	8,74	66,99	5,22
t30d	3,16E+08	8,50	80,96	7,81
t90d	1,19E+08	8,08	92,83	12,41

Taula 87. Recomples i percentatges de reducció obtinguts del procés de liofilització i emmagatzematge de la soca *Lactobacillus plantarum 2* durant 90 dies usant com a protector llet desnatada de vaca.

<i>L. plantarum 2</i> euga 15%MS	Recompte en valors absoluts	Recompte en log	% reducció en valors absoluts	% reducció en log
pre	1,70E+09	9,23		
t0d	1,20E+09	9,08	29,41	1,64
t7d	8,80E+08	8,94	48,24	3,10
t15d	8,70E+08	8,94	48,82	3,15
t30d	3,08E+08	8,49	81,88	8,04
t90d	3,29E+07	7,52	98,06	18,56

Taula 88. Recomples i percentatges de reducció obtinguts del procés de liofilització i emmagatzematge de la soca *Lactobacillus plantarum 2* durant 90 dies usant com a protector llet d'euga.

Les taules 87 i 88 mostren els recomptes obtinguts de liofilitzar i conservar la soca *Lactobacillus plantarum* 2 usant com a protector la llet d'euga i la de vaca. En la següent figura es pot observar la comparativa. La realització del T-test per a dues mostres relacionades ($\alpha=0,05$) posa de manifest la manca de diferències significatives entre els dos protectors (p-valor= 0,1).

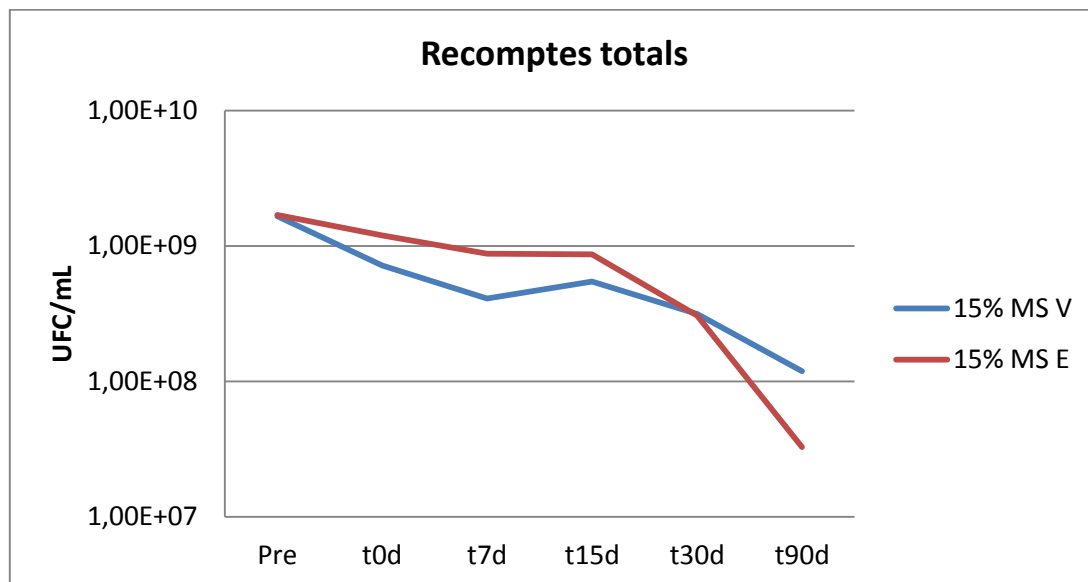


Figura 45. Evolució dels recomptes, en unitats formadores de colònia (UFC/mL), de la soca *Lactobacillus plantarum* 2 quan aquesta és sotmesa al procés de liofilització i emmagatzematge durant 90 dies. La llegenda mostra la concentració de matèria seca (MS) dels vials i l'origen de la llet usada com a protector (V= vaca. E=euga).

DISCUSSIÓ



1. Caracterització microbiològica de la llet d'euga al llarg de la gestació

1.1. Discussió sobre els recomptes microbiològics totals de les llets de dues eugues al llarg de la gestació

Els resultats obtinguts del recomptes microbians de les llets de les eugues 1 i 2 al llarg de dues gestacions no consecutives mostren que aquesta és, des del punt de vista microbiològic, apta per al consum humà. Aquesta afirmació es recolza en el fet que totes les mostres de llet crua analitzades en aquest assaig han presentat recomptes totals inferiors al $1,5 \times 10^6$ UFC/mL, límit establert per la legislació europea (Reglament (CE) N° 853/2004). Com indiquen Wells *et al.* (2012), la causa de la limitació de la proliferació de microorganismes pot ser la ubicació elevada del braguer de l'euga i la mida del mugró, les quals tendeixen a limitar-ne l'exposició.

El medi de cultiu que ha permès recuperar un major percentatge de la microbiota present ha estat el Columbia Agar amb Sang incubat durant 48 hores a 37°C (Figura 12), revelant la important presència d'espècies amb requeriments nutritius especials que resulten més difícils de cultivar (en anglès, *fastidious microbial species*). Aquesta presència ha estat observada anteriorment per diversos autors (Chambers, 2002; Hayes i Boor, 2001). És per això que l'ús de medis enriquits resulta més idoni que el medi Triptona Soja Agar per a obtenir recomptes totals més acurats.

Les dues eugues mostren tendències similars en l'evolució dels recomptes microbiològics al llarg del temps. Es pot apreciar com en tots els casos s'obté un p valor superior a 0,05 (Taula 26), degut a que els recomptes de microorganismes presents en la llet de les dues eugues no presenten diferències estadísticament significatives entre elles. Aquest fet també es pot observar mitjançant el coeficient de correlació de Pearson, el qual és positiu en tots els casos i en ocasions s'aproxima a $r = 1$. Ens trobem doncs en un cas d'acceptació de la hipòtesi nul·la d'igualtat de mitjanes. Aquesta progressió conjunta pot deure's a una manca de variabilitat deguda a factors intrínsecs de l'animal; per poder avaluar aquest tipus de variabilitats s'han de dur a terme estudis amb un nombre superior d'eugues.

Si tenim en compte l'evolució dels recomptes totals al llarg de les dues gestacions, es pot percebre com els màxims s'obtenen durant l'onzè mes de la primera gestació, i durant el tercer i vuitè mes de la tercera. Al sisè mes s'observa un mínim. Tal i com es pot observar a la Figura 46, els dos primers màxims mencionats coincideixen amb els períodes gestacionals de l'euga en els quals la producció de progesterona (i de progestàgens en general) és més intensa (Tsumagari *et al.*, 1991, Allen 2005). Inclòs en eugues avortades, els nivells de progestàgens s'elevan abans que aquest es produeixi (Hoffmann, 1996). El mínim detectat al sisè mes també es correspon amb el moment de menor activitat de progestàgens. Aquestes hormones migren a la llet, on es poden detectar (Borst *et al.*, 1985).

El tercer màxim pot estar relacionat amb el deslletament. En aquest moment els nivells de progesterona no haurien de ser elevats, però sí poden ser-ho els de corticoides, ja que suposa un procés estressant (Malinowski *et al.*, 1990). Tant la progesterona com els corticoides són molècules immunosupressores amb efectes antiinflamatoris. El sistema immunitari dels mamífers té un paper essencial en el manteniment de l'equilibri de les comunitats microbianes residents (Hooper *et al.*, 2012). Les alteracions en aquesta immunitat produïdes pels canvis hormonals podrien causar doncs desequilibris en les poblacions de microorganismes de la llet.

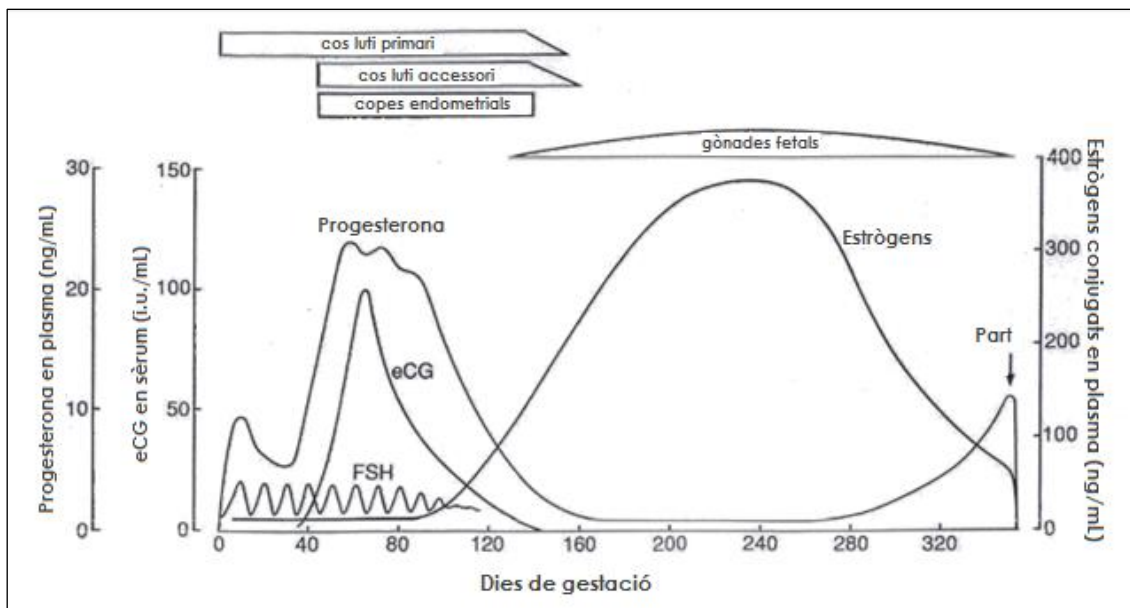


Figura 46. Resum de les concentracions plasmàtiques de les principals hormones presents durant la gestació de l'euga (adaptat de Allen, 2005).

Tot i que no sembla haver estudis sobre la relació entre els microorganismes de la llet i les hormones gestacionals, Scheibl i Zerbe (2000) van descriure com una concentració elevada de progesterona en sang dóna com a resultat problemes infecciosos de curs més sever i més persistents en les vaques. A més a més, disminueixen la *clearance* dels eritròcits recoberts d'anticòs *in vivo*. Van observar com la progesterona suprimeix els components específics del sistema immune i cèl·lules assassines naturals (*natural killers*, NK), mentre que té una influència positiva sobretot en altres components no específics, els quals podrien ser considerats com a mecanismes compensatoris per mantenir l'eficiència del sistema immunitari. En l'úter, també van ressenyar principalment efectes immunosupressors de la progesterona: disminució de la migració de leucòcits polimorfonuclears (PMN) a l'úter gràvid, persistència de bacteris, síntesi de proteïnes làcties uterines immunosupressores i disminució de la migració aleatòria de PMN, indicant un significat de la progesterona en la patogènesi de l'endometritis en la vaca i la gossa.

1.2. Discussió sobre els recomptes microbiològics totals de la llet d'Euga 1 en període no gestant

Els recomptes microbiològics obtinguts de la llet de l'Euga 1 en període no gestant van ser similars als obtinguts durant la gestació. A nivell de gèneres, cal destacar la presència de *Lactococcus* sp. i l'absència de *Lactobacillus* sp. El microorganisme que es va aïllar en major nombre correspon a *Kocuria* sp.

1.3. Discussió dels resultats dels aïllaments i caracteritzacions de les colònies obtingudes

La major part dels gèneres i espècies procedents de les diverses llets d'euga i que es van identificar a través de les diverses metodologies emprades en aquest estudi es corresponen amb microorganismes descrits en estudis previs. No és el cas dels gèneres *Pantoea*, *Hiphomicrobium*, *Cellulomonas* i *Burkholderia*, dels quals no s'ha trobat constància bibliogràfica del seu aïllament en llet d'euga o derivats. En el cas del gènere *Enterobacter*, trobem descrit en altres treballs l'espècie *Enterobacter cloacae* (Motta *et al.*, 2014; Prestes *et al.*, 1999), però no l'espècie *Enterobacter amnigenus* aïllada en aquest treball. De forma similar trobem descrites espècies del gènere *Enterococcus* com ara *Enterococcus faecium* (An *et al.*, 2004), però no es té constància de troballes de *Enterococcus durans* prèvies a aquest estudi en la llet crua d'euga, però sí en el kumis (Batdorj *et al.*, 2006).

El conjunt de les llets analitzades van mostrar absència de creixement dels següents patògens: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* i fongs productors de micotoxines. Aquestes dades concorden amb els citats per bibliografia (Wells *et al.*, 2012), on s'indica la manca general d'infeccions a la llet d'euga.

Pel que fa a l'hàbitat natural i la possible implicació a la llet de les principals soques aïllades, podem dir que la major part d'elles es troben de forma natural al medi ambient,

associades al sòl i a l'aigua. Alguns gèneres (*Pantoea*, *Enterobacter*, *Burkholderia*) s'han aïllat de vegetació fresca, podent tenir el seu origen en l'herba de l'aliment. En el cas de *Enterobacter* i *Enterococcus*, poden provenir de femtes. *Staphylococcus* spp. són comensals de la pell. Els gèneres *Lactobacillus* i *Lactococcus* són descrits àmpliament a la llet de la majoria de mamífers. El seu origen es creu que és intestinal, arribant a la glàndula per les femtes o per migració des de l'intestí de la mare a través dels vasos sanguinis.

Cal recordar que, tot i que alguns dels microorganismes trobats poden tenir implicacions patològiques, en cap dels anàlisis es varen localitzar en quantitats que poguessin indicar infecció de les mames. Per una altra banda, la seva presència sí té implicacions a l'hora de decidir la vida útil de la llet com a aliment cru. Cal doncs realitzar estudis sobre l'evolució del microbioma present a la llet d'egua.

2. Caracterització enzimàtica de la llet d'euga al llarg de la gestació

2.1. Discussió dels resultats corresponents a l'activitat enzimàtica total detectada a la llet d'euga mitjançant API ZYM®

Les activitats enzimàtiques totals de les llets d'ambdues eugues detectades amb el *kit* de API ZYM® mostren moltes similituds, presentant la mateixa mitjana, tot i que la llet d'Euga 1 presenta una desviació estàndard superior a la d'Euga 2 (Taula 33). A la Figura 15 es pot observar com la progressió al llarg del temps de les dues activitats és similar per a les dues eugues. Si s'observa la segona part de la gràfica (corresponent a la gestació més recent) es pot apreciar un augment d'aquesta activitat fins al quart mes de gestació, una disminució fins al setè mes i un augment novament al vuitè mes, coincidint amb la disminució de la productivitat de la llet degut al deslletament. Aquest augment significatiu no succeeix amb tanta intensitat quan les eugues no són deslletades, com s'observa a la primera part de la gràfica.

L'activitat total de cada enzim, en canvi, mostra petites diferències. Mentre que l'Euga 1 mostra com a activitat enzimàtica més important la de l'esterasa C:4, l'Euga 2 té com a principal enzim la leucina arilamidasa. La diferència és, però, poc elevada, i ambdós enzims ocupen en les dues eugues els dos primers llocs en quant a intensitat es refereix, mostrant més de 200 nmol totals d'activitat. En segon terme, trobem una sèrie d'enzims amb una activitat compresa entre els 150 i els 50 nmol de substrat hidrolitzats: són l'esterasa lipasa C:8, les fosfatases àcida i alcalina, la valina arilamidasa, la naftol-AS-

bi-fosfohidrolasa i la β -glucuronidasa, que difereixen lleugerament en l'ordre d'intensitat entre les dues eugues. Els enzims d'aquest segon grup, al igual que els del primer, mostren una activitat persistent al llarg del temps, estant presents en moltes ocasions en el 100% de les mostres. Seguidament trobem un altre grup que presenta una activitat menys intensa, entre 50 i 10 nmol, on trobem la N-acetil- β -glucosaminidasa, la tripsina, la α -fucosidasa, la β -glucosidasa i la cistina arilamidasa. La presència d'aquests enzims és intermitent, i algun d'ells no es presenta en cap ocasió en una de les dues eugues (Taula 35). Finalment, una sèrie d'enzims no presenten cap tipus d'activitat a les llets analitzades, on trobem la lipasa C:14, la α -quimiotripsina fosfohidrolasa, la α -galactosidasa, la β -galactosidasa, la α -glucosidasa i la α -manosidasa.

Si analitzem la constància d'aparició de cada enzim, veiem que hi ha certs enzims presents a totes les llets d'ambdues eugues: fosfatasa alcalina, esterasa i esterasa lipasa, leucina i valina arilamidasa. Aquests enzims són seguits de molt a prop per la fosfatasa àcida i la naftol-AS-bi-fosfohidrolasa, els quals són presents almenys en 9 de les 11 mostres de cada euga. La resta d'enzims es poden considerar d'aparició intermitent.

La presència d'una activitat enzimàtica duta a terme per enzims constitutius a la llet d'euga és, doncs, un fet real. Aquesta activitat és, en molts casos, constant, i posseeix un potencial per a produir canvis en la composició de la llet a través de la hidròlisi de lípids (lipòlisi), proteïnes (proteòlisi) i carbohidrats (glicòlisi).

2.2. Discussió dels resultats corresponents a l'activitat de cadascun dels enzims detectats a la llet d'euga mitjançant API ZYM®

Dels 19 enzims constitutius analitzats amb el *kit* API ZYM®, 13 mostren activitat en alguna de les llets mostrejades. La intensitat de la seva acció, així com la constància en la seva aparició, són analitzats a continuació.

2.2.1. Esterases i lipases

L'esterasa C:4 mostra una activitat elevada i constant al llarg de les gestacions, assolint la màxima intensitat entre el 3r i el 4t mes, disminuint de forma important fins al 7è mes i recuperant-se posteriorment.

L'esterasa lipasa C:8 també posseeix una activitat elevada i constant, augmentant progressivament la seva intensitat fins al 3r i el 4t mes de gestació, on es produeix un pic. Posteriorment, l'activitat disminueix de nou, per augmentar al deslletament. En la primera gestació, on no es va produir aquest deslletament, trobem un segon pic al 9è mes, menys intens, acompanyat d'una disminució fins a l'11è. Aquests dos enzims hidrolitzen els àcids grassos i els triglicèrids.

La persistent activitat esterasa es comuna a la llet, la qual conté diversos tipus de l'enzim segons el tipus d'èsters que hidrolitzen (aromàtics, alifàtics, èsters de colina). Les esterases que presenten major activitat de forma general a la llet són les de tipus B, on s'inclou l'esterasa lipasa, que presenta una marcada activitat en aquest estudi (Fox, 2003b). A la llet poden causar enranciment, disminuint la qualitat final d'aquesta. Cal però recordar que els lípids lactis es troben en glòbuls grassos en emulsió, els quals confereixen una certa protecció envers l'acció enzimàtica. El trencament del glòbul pot ser espontani (la qual depèn de factors molt diversos com ara l'individu, la raça, l'estat de la lactància o el nivell de producció), o induït (degut als processos mecànics als que se sotmet la llet una vegada s'ha extret i a l'acció microbiana) (Chávez *et al.*, 2007). La seva acció dependrà, per tant, de la disponibilitat en la qual es trobin els àcids grassos i èsters a la llet.

2.2.2. Proteases

La leucina arilamidasa és, juntament amb l'esterasa C:4, l'enzim que mostra una activitat més intensa a la llet. Persistent al llarg de la gestació, a grans trets va augmentant fins al 6è mes, mostra un petit descens al 7è mes, elevant-se de nou durant el 8è mes, hi hagi o no deslletament, fins a final de gestació. Aquest enzim, també conegut com a leucina aminopeptidasa (LAP), es troba present en els cocs Gram

positius, principalment en el gènere *Streptococcus* spp. Aquests tipus de microorganismes han estat detectats en un nombre elevat d'ocasions a les llets d'euga avaluades en aquest estudi (vegeu Taules 28 i 29 a l'apartat Resultats). S'ha pogut observar una manca de presència d'estreptococs en la llet d'ambdues eugues el 7è mes de gestació, coincidint amb un petit descens en la producció de l'enzim. Això ens pot indicar un possible origen bacterià de part de l'activitat LAP trobada.

La valina arilamidasa té una activitat constant però d'intensitat inferior a les anteriors. Mostra un màxim al 4t mes i al 8è mes si hi ha deslletament. Si aquest no es produeix, continua constant fins al 11è. Aquest enzim propicia la solubilització de la caseïna, produint pèptids petits i aminoàcids lliures. La valina, juntament amb la leucina i l'isoleucina són una font d'energia important per a la glàndula mamària, aportant carboni i nitrogen per a la síntesi d'aminoàcids no essencials (Wohlt *et al.*, 1977). Aquest fet podria estar relacionat amb aquesta present activitat leucina i valina arilamidasa, l'origen de la qual podria trobar-se en el teixit mamari.

La fosfatasa alcalina mostra una activitat baixa però constant al llarg de la gestació, augmentant molt substancialment en el vuitè mes de la tercera gestació, coincidint amb el deslletament dels poltres. Aquest enzim es troba estretament lligat al glòbul gras (Alais, 1985), i té un paper clau en la llet crua, ja que facilita l'accés al fòsfor i al calci per a la seva absorció intestinal posterior per part del poltre (Revira i Pons, 1999).

La fosfatasa àcida mostra uns nivells baixos i constants d'activitat al llarg del temps, mostrant pics d'intensitat diferents segons l'euga (10è mes a Euga 2, 4t mes a Euga 1). Al vuitè mes de gestació pateix un augment molt important en el cas que els poltres siguin deslletats. La persistent i intensa activitat d'aquest enzim pot produir una intensa hidròlisi de la caseïna. És per això que aquest enzim s'utilitza com a indicador del deteriorament de la llet (Alais, 1985).

En vaques, l'activitat fosfatasa augmenta a final de la lactància i a l'hivern. (Haab *et al.*, 1956). En el cas de les eugues no hi ha estudis previs sobre l'evolució d'aquests enzims; en el cas d'Euga 1 i 2 s'observa un augment coincidint amb la retirada del poltre, el que es podria considerar final de la lactància, la qual a més a més es va produir durant els mesos d'hivern.

L'activitat naftol-AS-bi-fosfohidrolasa és menys constant i mostra diferències entre les dues eugues, principalment entre els mesos 1 i 4 de gestació. El pic més important es mostra en el deslletament, on els nivells són entre 3 i 4 vegades més elevats. Si no es duu a terme el deslletament, els nivells es mantenen presents però en baixes quantitats fins al 11è mes de gestació. La seva possible implicació a la llet no s'ha descrit en cap estudi previ.

2.2.3. Amilases

La presència d'activitat β -glucuronidasa també és menys constant a les llets, i sembla augmentar a finals de la lactació, sigui aquesta induïda per deslletament al 8è mes o abans del part al 11è mes. Es tracta d'un enzim àmpliament descrit a la llet (Shahani *et al.*, 1973; El-Kholy *et al.*, 1991; Ince *et al.*, 1995), que pot arribar a causar icterícia en neonats.

L'activitat N-acetil- β -glucosaminidasa és baixa i inconstant i mostra diferències visibles entre les dues eugues. L'Euga 2 presenta nivells més elevats d'aquesta activitat en general, mostrant un pic al 9è mes de gestació, i presentant alt i baixos al llarg d'aquesta. L'Euga 1 presenta una activitat molt baixa, inconstant i al límit de detecció del sistema. Ambdues eugues no registren activitat al 8è mes de la gestació en la qual es va interrompre la lactació. Aquest enzim es troba present en diversos teixits i secrecions mamàries, i s'ha descrit en la llet bovina, humana, caprina i porcina. La major part s'origina a les cèl·lules epitelials de la glàndula mamària, variant la seva activitat entre lactacions i durant aquestes, i mostrant una major activitat en les vaques seques (Farkye, 2003).

Les activitats fosfatasa àcida i N-acetil- β -glucosaminidasa podrien atribuir-se a efectes de l'alimentació de temporada. Estudis sobre l'activitat conjunta d'aquests dos enzims (Bagnicka *et al.*, 2008) suggereixen que l'activitat d'aquestes en llets en vaques lliures de mastitis poden ser un indicador de l'eficiència del sistema d'alimentació aplicat.

L'activitat α -fucosidasa es detecta inconstantment en ambdues eugues, mostrant un pic al deslletament en el cas d'Euga 1. La llet humana és rica en oligosacàrids fucosilats, i mostra també activitat fucosidasa, la qual és més alta a l'inici de la lactació, disminuint notòriament fins a la segona setmana i incrementant-se de nou fins la seva fi (Wiederschain i Newburg, 1995).

2.3. Discussió dels resultats corresponents a la comparació de l'activitat enzimàtica present a les llets de vaca, truja i euga, detectada mitjançant API ZYM®

Els perfils observats en l'anàlisi de la llet de 8 llets de truja mostra com els enzims més actius en aquest cas són la fosfatasa àcida, juntament amb la naftol-AS-bi-fosfohidrolasa i la β -glucuronidasa (activitat mitjana de 40 nanomols de substrat hidrolitzats). En segon lloc, trobem la fosfatasa alcalina i la α -glucosidasa (30 nmol), seguides de la N-acetil- β -glucosaminidasa (20 nmol). A continuació trobem les activitats leucina arilamidasa i valina arilamidasa (5 nmol). Per últim, la α -fucosidasa, esterasa C:4 i esterasa lipasa C:8 (2,5 nmol).

En el cas de les 4 llets de vaca, l'anàlisi mostra com a enzims amb més activitat la fosfatasa alcalina, la fosfatasa àcida i la naftol-AS-bi-fosfohidrolasa (40 nanomols d'activitat mitjana). Els altres enzims que van ser actius, però en molta menor intensitat, van ser l'esterasa C:4 i la leucina arilamidasa (uns 12 nmol), la β -glucuronidasa i l'esterasa lipasa C:8 (uns 7 nanomols), la N-acetil- β -glucosaminidasa (5 nmol) i finalment la α -manosidasa i la valina arilamidasa (2,5 nmol).

Si comparem les activitats enzimàtiques detectades amb el *kit* API ZYM® en la llet d'aquestes diverses espècies de mamífers, podem veure com existeixen diferències tant en els perfils com en la intensitat de l'activitat d'aquests enzims. En termes generals, podem dir que a la llet de les tres espècies existeixen enzims proteolítics en grans quantitats. A la llet d'euga, també hi ha un potencial de lipòlisi important, mentre que a la llet de truja té gran capacitat de descomposició de carbohidrats complexos.

3. Avaluació del potencial probiòtic dels bacteris àcid làctics de la llet d'euga

3.1. Discussió dels resultats corresponents a l'avaluació de la seguretat de les soques BAL equines

3.1.1. Discussió dels resultats corresponents a la sensibilitat als antibiòtics

De les 11 soques analitzades, 5 van mostrar resistències a algun antibiòtic. Aquestes resistències poden ser intrínseques o adquirides. Per tal de valorar aquest fet, cal caracteritzar genèticament les soques i trobar els gens de resistència implicats (EFSA, 2012).

La Comissió FEEDAP (2012) considera que:

- Qualsevol soca bacteriana que porta una resistència intrínseca a algun antimicrobià presenta un potencial mínim per a la propagació horitzontal i, per tant, pot ser usat com un additiu.
- Qualsevol soca bacteriana que porta una resistència adquirida a antimicrobians que es mostra que és a causa de la mutacions cromosòmiques presenta un baix potencial de propagació horitzontal i generalment es pot usar com a additiu.

- Qualsevol soca bacteriana que hagi adquirit resistència al(s) antimicrobià(ns) que es mostra que és causa de l'adquisició de determinants genètics presenta el major potencial de propagació horitzontal i no ha de ser utilitzat com a additiu.
- En absència d'informació sobre la naturalesa genètica d'una resistència demostrada, la soca no s'ha d'utilitzar com a additiu.

Les soques que no van presentar resistències i per tant es considerarien segures són: *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 2, *Lactobacillus plantarum* 3, *Lactobacillus plantarum* 5, *Lactococcus brevis* 2 i *Lactococcus lactis*.

La combinació de tres metodologies per detectar resistències a antibiòtics ens ha permès realitzar l'anàlisi de seguretat de forma més eficient. La metodologia que ens dona un resultat més acurat és el mètode d'avaluació de la MIC en agar MRS, a l'oferir dades quantificables.

3.1.2. Discussió dels resultats corresponents a la capacitat hemolítica

De les 11 soques analitzades, 6 no presenten hemòlisi i 3 produeixen hemòlisi parcial de la sang. Cap de les soques BAL estudiades presenta hemòlisi total.

3.2. Discussió dels resultats corresponents a la resistència a les condicions gastrointestinals per part de les soques BAL equines

De les 11 soques analitzades, 9 soques van superar els diversos assajos realitzats (resistència a sals biliars, a lisozim i al peròxid d'hidrogen, així com a les condicions de pH àcid). Les dues soques restants no van ser resistents a pH entre 2 i 4, i per tant no es van considerar resistents a les condicions gastrointestinals.

Les soques que van mostrar capacitat de resistència gastrointestinal van ser: *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 2, *Lactobacillus plantarum* 3, *Lactobacillus plantarum* 4, *Lactobacillus plantarum* 5, *Lactobacillus plantarum* 6,

Lactobacillus brevis 1, *Lactobacillus brevis* 2, *Enterococcus faecium*.

3.3. Discussió dels resultats de l'avaluació final del potencial probiòtic de les soques BAL equines

Després de la realització de les diverses proves discutides anteriorment, les soques BAL que van presentar un potencial ús com a probiòtics per la seva seguretat i resistència a condicions similars a les gastrointestinals van ser: *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 2, *Lactobacillus plantarum* 3, *Lactobacillus plantarum* 5 i *Lactococcus brevis* 2.

4. Avaluació de la producció de substàncies antimicrobianes

4.1. Discussió dels resultats corresponents a l'assaig de difusió en agar

4.1.1. Discussió dels resultats de la mesura del pH i la temperatura inicials dels sobrenedants assajats

Els pHs dels sobrenedants obtinguts al centrifugar els cultius de les soques de bacteris àcid làctics (BALs) a les 24 hores de la seva incubació van oscil·lar entre 3,87 i el 4,8. Les soques del gènere *Lactobacillus* spp. van obtenir pHs més baixos que les soques de *Lactococcus* sp. i *Enterococcus* sp.

Aquestes diferències de pH poden ser degudes a la capacitat de cadascuna de les soques per metabolitzar els diferents components del medi MRS i de la tolerància a les condicions d'incubació a les que es van sotmetre els cultius (37°C en aerobiosi).

4.1.2. Discussió dels resultats de les activitats antimicrobianes de les soques BAL detectades mitjançant l'assaig de difusió en agar

El 100% de les soques de BAL equines assajades mitjançant el mètode de difusió en agar mostren activitats antimicrobianes. La soca mostra activitat enfront a un major número de microorganismes patògens o causants de deteriorament va ser *Lactobacillus plantarum* 3 (12/12, 100% d'activitat), seguida de *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 2, *Lactobacillus plantarum* 4 i *Lactobacillus brevis* 1 (11/12, 91,67% d'activitat), *Lactobacillus plantarum* 6 (10/12, 83,33%), *Lactococcus lactis* i *Enterococcus durans* (9/12, 75%), *Lactobacillus plantarum* 5 (8/12, 66,67%) i finalment *Lactobacillus brevis* 2 i *Enterococcus faecium* (5/12, 41,67%).

De la mateixa forma, el 100% dels microorganismes patògens o causants de deteriorament sobre els quals es va realitzar l'assaig són inhibits per alguna soca BAL equina. Els microorganismes s'ordenen, de major a menor sensibilitat, de la següent forma: *Kocuria rhizophila* (11/11, 100% de sensibilitat), *Pantoea* sp., *Bacillus cereus* i *Pseudomonas aeruginosa* (10/11, 90,91% de sensibilitat), *Salmonella enterica*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* (9/11, 81,82% de sensibilitat), *Bacillus subtilis* (8/11, 72,73% de sensibilitat), *Listeria monocytogenes* (7/11, 63,64% de sensibilitat), *Enterococcus faecalis* (6/11, 54,55% de sensibilitat) i *Proteus vulgaris* (5/11, 45,45% de sensibilitat).

Si s'analitza el percentatge d'activitat mostrada per cada soca BAL respecte al total d'assajos realitzats (sobrenedants, *pellets* i sobrenedants tractats), es perceben diferències que situen els percentatges de la següent forma: *Lactobacillus plantarum* 3 (25/48, 52,08% d'activitat), *Lactobacillus plantarum* 4 (26/28, 54,17% d'activitat), *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 2 i *Lactobacillus brevis* 1 (23/48, 47,92% d'activitat), *Lactobacillus plantarum* 6 (22/48, 45,83% d'activitat), *Lactobacillus plantarum* 5 (21/48, 43,75% d'activitat), *Lactococcus lactis* (19/48, 39,58% d'activitat) *Enterococcus durans* (16/48, 33,33% d'activitat), *Lactobacillus brevis* 2 (7/48, 14,58% d'activitat) i finalment *Enterococcus faecium* (6/48, 12,5% d'activitat).

Realitzant la mateixa operació en relació al nombre de microorganismes indesitjables respecte al total d'assajos realitzats, *Kocuria rhizophila* continua sent el més sensible (30/44, 68,18% de sensibilitat), seguit de *Bacillus cereus* (22/44, 50% de sensibilitat), *Pseudomonas aeruginosa* (21/44, 47,73% de sensibilitat), *Klebsiella oxytoca* (20/44, 45,45% de sensibilitat), *Pantoea* sp. (19/44, 43,18% de sensibilitat), *Salmonella enterica* (18/44, 40,90% de sensibilitat), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis* (17/44, 38,64% de sensibilitat), *Listeria monocytogenes* 12/44, 27,27% de sensibilitat), *Enterococcus faecalis* (10/44, 22,73% de sensibilitat) i *Proteus vulgaris* (8/44, 18,18% de sensibilitat).

De les quatre porcions assajades, el sobrenedant sense tractar és la que mostra més activitat (98 resultats positius/ 132 assajos, 74,24% de sobrenedants actius). Les soques s'ordenen, de major a menor activitat del sobrenedant, de la següent forma: *Lactobacillus plantarum* 3 i *Lactobacillus plantarum* 4 (12/12, 100% d'activitat), *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 2 i *Lactobacillus brevis* 1 (11/12, 91,67% d'activitat), *Lactobacillus plantarum* 6 (10/12, 83,33% d'activitat), *Enterococcus durans* (9/12, 75% d'activitat), *Lactobacillus plantarum* 5 i *Lactococcus lactis* (8/12, 66,67% d'activitat), *Lactobacillus brevis* 2 (5/12, 41,67% d'activitat) i *Enterococcus faecium* (1/12, 8,33% d'activitat).

Després del sobrenedant sense tractar, la següent porció amb major activitat és el sobrenedant amb tractament tèrmic (80°C, 10 min) (82 resultats positius/ 132 assajos, 62,12% de sobrenedants amb tractament tèrmic actius). Les soques s'ordenen, de major a menor activitat del sobrenedant tractat tèrmicament, de la forma següent: *Lactobacillus plantarum* 3 i *Lactobacillus plantarum* 4 (11/12, 91,67% d'activitat), *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 6 i *Lactobacillus brevis* 1 (10/12, 83,33% d'activitat), *Lactobacillus plantarum* 2 (9/12, 75% d'activitat), *Lactococcus lactis* (7/12, 58,33% d'activitat), *Lactobacillus plantarum* 5 i *Enterococcus durans* (6/12, 50% d'activitat), i *Lactobacillus brevis* 2 (2/12, 16,67% d'activitat). *Enterococcus faecium* va ser l'únic BAL que no va mostrar cap activitat del sobrenedant amb tractament tèrmic.

Seguidament, la porció amb major activitat és el *pellet* (28 resultats positius/ 132 assajos, 21,21% de *pellets* actius). Les soques s'ordenen, de major a menor activitat,

com seguidament s'expressa: *Lactobacillus plantarum* 5 (6/12, 50% d'activitat), *Enterococcus faecium* (5/12, 41,67% d'activitat), *Lactobacillus plantarum* 2 i *Lactobacillus plantarum* 4 (3/12, 25% d'activitat), *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 3, *Lactobacillus plantarum* 6, *Lactobacillus brevis* 1 i *Lactococcus lactis* (2/12, 16,67% d'activitat), i *Enterococcus durans* (1/12, 8,33% d'activitat). El *pellet* de la soca *Lactobacillus brevis* 2 no va mostrar activitat enfront a cap dels microorganismes.

Finalment, la porció que menor activitat mostra és el sobrenedant amb el pH tamponat a 7 (2 resultats positius/ 132 assajos, 1,52% de sobrenedants tamponats actius), el qual només té activitat en el cas de *Lactococcus lactis* (2/12, 16,67% d'activitat).

4.1.3. Discussió dels resultats dels valors d'inhibició mostrats per les soques BAL obtinguts mitjançant l'assaig de difusió en agar

El valor d'inhibició (VI) que es pot obtenir de la mesura dels halos d'inhibició ens permet analitzar de forma qualitativa la intensitat de l'acció antimicrobiana present.

La fracció que mostra més intensitat d'acció, mostrant un valor d'inhibició més elevat és el sobrenedant sense tractar (suma dels VI = 221,3), seguida del sobrenedant tractat tèrmicament (suma dels VI= 194,9), el *pellet* (suma dels VI= 29,15) i finalment el sobrenedant de pH tamponat (suma dels VI= 2).

El microorganisme que va ser inhibit amb major intensitat va ser *Kocuria rhizophila*, que va obtenir un valor total d'inhibició dues vegades superior a la resta (suma dels VI= 96,95). Seguidament, i per ordre decreixent d'intensitat, els microorganismes s'ordenen de la següent forma: *Pantoea* sp. (suma VI= 45,85), *Klebsiella oxytoca* (suma VI= 41,85), *Pseudomonas aeruginosa* (suma VI= 37,3), *Escherichia coli* (suma VI= 35,6), *Salmonella enterica* (suma VI= 31,65), *Staphylococcus aureus* (suma VI= 30,8), *Bacillus subtilis* (suma VI= 27,55), *Listeria monocytogenes* (suma VI= 27,5), *Bacillus cereus* (suma VI= 23,85), *Proteus vulgaris* (suma VI= 19,65), i *Enterococcus faecalis* (suma VI= 18,8).

En determinades ocasions els halos d'inhibició poden presentar colònies visibles a simple vista en el seu interior, formant el que es classifica com a halos parcials. Si no es tracta de contaminacions, aquestes colònies poden ser mutants resistents, poblacions heterogènies o cultius mixtes (Cantón, *et al.*, 2000). Aquestes adaptacions per part dels bacteris no són desitjables, ja que promouen la selecció de resistències produint que les infeccions siguin menys tractables (Andersson, 2003).

Si analitzem la quantitat d'halos parcials en relació a la totalitat d'halos presents, es pot observar com les diferents soques de BAL els produeixen en diferents quantitats, ordenats de major a menor quantitat: *Lactobacillus brevis* 2 (6/7, 85,71%), *Lactobacillus plantarum* 6 (15/22, 68,18%), *Enterococcus durans* (9/16, 56,25%), *Lactobacillus plantarum* 4 (13/26, 50%), *Lactococcus lactis* (8/19, 42,11%), *Lactobacillus plantarum* 5 (8/21, 38,1%), *Lactobacillus brevis* 1 (5/23, 21,74%), *Lactobacillus plantarum* 1 (3/23, 13,04%) i *Lactobacillus plantarum* 3 (2/25, 8%). Les soques *Lactobacillus plantarum* 2 i *Enterococcus faecium* no van presentar halos parcials.

Per altra banda, si s'analitza la presència d'halos parcials en relació al total d'halos des del punt de vista del microorganisme que es desitja inhibir, també es pot observar com alguns d'ells tenen més predisposició a formar-los. *Bacillus subtilis* va ser el microorganisme que va mostrar més halos parcials amb diferència (12/17, 70,59%), seguit de *Salmonella enterica* (9/18, 50%), *Klebsiella oxytoca* (8/20, 40,00%), *Listeria monocytogenes* (5/12, 41,67%), *Pseudomonas aeruginosa* (8/21, 38,1%), *Bacillus cereus* (7/22, 31,82%), *Escherichia coli* (5/17, 29,41%), *Proteus vulgaris* (2/8, 25%), *Enterococcus faecalis* (2/10, 20,00%), *Staphylococcus aureus* (3/17, 17,65%), i *Pantoea* sp. (3/19, 15,79%) i *Kocuria rhizophila* (3/20, 15,00%).

De forma genèrica podem dir que la soca làctica que presenta més activitat antimicrobiana enfront a una major diversitat de microorganismes patògens o causants de deteriorament és *Lactobacillus plantarum* 3. Juntament amb *Lactobacillus plantarum* 1, també és la soca que inhibeix amb més intensitat els altres microorganismes, presentant valors d'inhibició més elevats que la resta de soques assajades.

El microorganisme més sensible a l'acció de les diverses soques làctiques és *Kocuria rhizophila*. A més de ser la soca amb sensibilitat més àmplia en quant al número de soques làctiques amb capacitat d'inhibir-la (les 11 soques assajades van mostrar inhibició), també és la que mostra una inhibició més intensa, és a dir, la que presenta halos d'inhibició de major mida.

El fet que la porció que es mostra més activa sigui el sobrenedant sense tractament ens indica que els tractaments aplicats sobre aquest inhibeixen els diferents components antimicrobians presents: el tamponament del pH és el tractament que més disminueix les activitats dels sobrenedants, anul·lant-los en la majoria de casos. Això porta a pensar que els principals causants de l'activitat antimicrobiana són els àcids orgànics alliberats del metabolisme fermentatiu de les soques làctiques i que per tant el pH és el factor més important a l'hora de limitar el creixement dels microorganismes indesitjables, afavorint a la vegada el desenvolupament de les soques de BAL. Aquesta afirmació també es fonamenta en el fet que les soques que mostren pHs més àcids a les 24 hores d'incubació (Taula 40) es corresponen amb aquelles que tenen valors d'inhibició més elevats per part del sobrenedant sense tractament.

El tractament tèrmic a 80°C durant 10 minuts també disminueix en ocasions els valors d'inhibició. Si s'observa l'anàlisi estadístic de la Taula 64 es pot veure com els sobrenedants de les soques *Lactobacillus plantarum* 1 i *Lactobacillus brevis* 1 mostren un descens significatiu en la capacitat antimicrobiana quan són tractats tèrmicament. Com en aquest cas el pH no es modifica, aquest fet es pot atribuir a la presència en el sobrenedant de substàncies actives termosensibles, com pot ser el cas de les bacteriocines de classe III o bacteriolisines (Klaenhammer, 1993). Lash *et al* (2005), van caracteritzar parcialment una bacteriocina termosensible procedent de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. No es té constància anterior de bacteriocines termolàbils generades per *Lactobacillus brevis*. La soca *L. brevis* 1 genera peròxid d'hidrogen; el descens en la intensitat de la seva acció podria ser deguda a una inactivació d'aquest peròxid a causa de l'increment de temperatura (Blanco-Brieva *et al.*, 2012).

Lactococcus lactis va ser l'única espècie que va mostrar activitat en sobrenedant tamponat, mostrant halos d'inhibició per a *Pantoea* sp. i per a *Klebsiella oxytoca*. Aquesta activitat pot ser atribuïble, per exemple, a la presència de bacteriocines com la

nisina (Cheigh *et al.*, 2002; De Vuyst i Vandamme, 1992), la lacticina (Piard *et al.*, 1992), o similars.

La llet crua representa una font de noves soques de BAL amb el potencial d'inhibir la microbiota indesitjable, podent utilitzar-se per a la biopreservació de productes lactis (Rodríguez *et al.*, 2000), ensitjats (Gollop *et al.*, 2005), carns (Stiles i Hastings, 1991), vegetals (Trias *et al.*, 2010), etc.

4.2. Discussió dels resultats corresponents a la producció de peròxid d'hidrogen

La formació de peròxid d'hidrogen va ser positiva en 6/11 soques làctiques (54,5%). Les soques que van mostrar una producció més intensa van ser *Lactobacillus plantarum* 6, *Lactobacillus brevis* 1 i *Enterococcus faecium*. També van mostrar activitat, tot i que en menys intensitat, les soques *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 2, i *Lactobacillus brevis* 2.

Aquesta activitat per part dels BAL ha estat mencionada per altres autors en aïllats procedents de diverses fonts com poden ser el formatge (Herreros *et al.*, 2005), la vagina (Eschenbach *et al.*, 1989), o l'intestí humà (Pridmore *et al.*, 2008), però no hi ha constància de la seva troballa en soques procedents de la llet crua.

5. Capacitat de protecció de soques làctiques de la llet d'euga

5.1. Discussió dels resultats de l'assaig de conservació en llet d'euga de soques de *Lactobacillus* spp. i de *Lactococcus lactis* equines

5.1.1. Discussió dels resultats de la conservació de la viabilitat de les soques làctiques al procés de liofilització

Si es compara la pèrdua de viabilitat deguda al procés de la liofilització entre els vials que incorporen llet d'euga i els seus respectius controls sense llet per cadascuna de les quatre soques assajades (diferència entre els valors pre liofilització i temps 0), es pot observar com, a l'incorporar llet d'euga al medi de suspensió, la viabilitat de les soques es manté pràcticament inalterada. Aquest fet no succeeix en els controls, els quals pateixen una disminució d'aproximadament una unitat logarítmica en tots els casos.

5.1.2. Discussió dels resultats de la conservació de la viabilitat de les soques làctiques al llarg de 90 dies d'emmagatzemament

5.1.2.1. *Lactobacillus plantarum* 3 (condicions de conservació: 4°C, buit i absència de llum)

La conservació de la viabilitat d'aquesta soca en suspensió tamponada (control) continua disminuint les següents 48 hores després de la lioflització, estabilitzant-se posteriorment i mantenint-se fins a 15 dies, moment en el qual tendeix de nou a disminuir. Als 90 dies de conservació, la reducció respecte al valor inicial és d'aproximadament dues unitats logarítmiques. En el cas dels vials amb llet d'euga es pot veure com la viabilitat es manté pràcticament sense alterar al llarg dels 90 dies. La pèrdua total no suposa un descens important (inferior a una unitat logarítmica).

5.1.2.2. *Lactobacillus plantarum* 2 (condicions de conservació: T^a ambient, buit i absència de llum)

Quan es preserva aquesta soca en *buffer* fosfat, la viabilitat disminueix gradualment durant els primers 30 dies d'emmagatzematge fins a disminuir una unitat logarítmica. Als 90 dies de conservació, la reducció respecte al valor inicial és de 4 unitats logarítmiques. En el cas dels vials amb llet d'euga s'observa com la viabilitat es manté pràcticament inalterada fins als 15 dies, moment en el que inicia un descens que, als 90 dies, assoleix aproximadament una unitat logarítmica.

La comparació de la pèrdua de viabilitat de *Lactobacillus plantarum* 3 i *Lactobacillus plantarum* 2 ens permet observar l'efecte del fred sobre la conservació d'aquesta espècie, sobretot a llarg termini. En el cas dels controls preservats durant 90 dies en *buffer*, la pèrdua de viabilitat resulta més d'un 50% inferior si la soca es conserva en fred (40% de pèrdua a temperatura ambient enfront a un 16% a 4°C). Si s'addiciona llet d'euga com a protector, aquesta diferència també existeix de forma marcada (10-15% de pèrdua enfront un 2-4% aproximadament). Sembla doncs que l'emmagatzematge dels vials en fred afavoreix la conservació a llarg termini de *Lactobacillus plantarum*.

5.1.2.3. *Lactobacillus brevis* 1 (condicions de conservació: 4°C, buit i absència de llum)

La viabilitat d'aquesta soca al llarg del temps en el cas de no addicionar protector (control), es manté durant els primers 15 dies d'emmagatzematge, perdent-se progressivament des de llavors i fins els 90 dies, amb un descens aproximat de 0.5 unitats logarítmiques. En el cas dels vials amb llet d'euga la viabilitat es conserva els 30 primers dies pràcticament sense alterar, iniciant-se una disminució fins als 90 dies que arriba fins a una unitat logarítmica. Comparada amb els vials control, la disminució entre el dia 30 i el 90 és més marcada, però la disminució total (comptant la pèrdua pre liofilització – temps 0) és menor.

5.1.2.4. *Lactococcus lactis* (condicions de conservació: 4°C, buit i absència de llum)

Es pot observar com el control és la concentració que presenta major pèrdua de la viabilitat al llarg dels 90 dies. Comparada amb les soques de *Lactobacillus* spp., la pèrdua deguda a l'emmagatzematge és reduïda (inferior a 1 unitat logarítmica), tot i que la pèrdua deguda al procés de liofilització (diferència entre preliofilització i temps 0) és la més elevada (superior a 1 unitat logarítmica). Pel que fa la resta de concentracions de llet en pols, s'observen augments i disminucions de la viabilitat quan la tendència hauria de ser una disminució progressiva o un manteniment d'aquesta.

Lactococcus lactis presenta diferències respecte al gènere *Lactobacillus* en quant a manteniment de la viabilitat es refereix. A la Figura 39 no s'observa una marcada diferència entre el control i la resta de concentracions com és el cas de les figures corresponents a les soques de *Lactobacillus* spp. (Figures 30, 33 i 36). Aquest fet és probablement degut a una manca d'homogeneïtzació de la biomassa centrifugada durant la preparació dels vials, que resulta en uns recomptes preliofilització molt diferents entre sí. Aquest biaix gràfic es corregeix en les Figures 40 i 41, on es mostra la reducció (en percentatge) de viabilitat de la soca. Els augments de viabilitat al llarg del temps que presenten en alguns casos els vials amb llet d'euga es poden explicar també per la

manca d'homogeneïtzació de la biomassa inicial, la qual podria estar causada per la formació d'agregats difícils de trencar en suspensió.

Alguns estudis com els que es citen posteriorment atribueixen la creació d'agregats en l'espècie *Lactococcus lactis* a la formació del pili. L'anàlisi de lactococs aïllats d'ambients clínics i vegetals mostren la producció de pili sota condicions estàndard de creixement. La identificació de pili funcionals suggereix que els canvis que promouen amb aquesta agregació i en la formació de biofilms s'han de tenir en compte en les seves possibles aplicacions (Oxaran *et al.*, 2012). Aquest pili és capaç d'adherir-se a les cèl·lules epitelials de l'intestí, promovent la seva persistència i els seus efectes beneficiosos (Meyrand *et al.*, 2013).

5.1.3. Concentracions de llet d'euga òptimes per a la conservació de les diferents soques BAL equines

Les concentracions de matèria seca òptimes per a la liofilització i conservació a llarg termini de les diferents soques làctiques emprades en aquest estudi s'han decidit en funció dels resultats obtinguts a les Taules 69, 73, 77 i 81, i s'expressen a la taula 89.

	Condicions emmagatzematge	%MS òptima	
		t0d	t90d
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	4°C, buit	10%	25%
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	T° ambient, O ₂	10%	20%
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	4°C, buit	5%	20%
<i>Lactococcus lactis</i>	4°C, buit	10%	20%

Taula 89. Concentracions de llet d'euga en pols per a una òptima conservació de la viabilitat de diferents soques làctiques equines.

Dels resultats s'extreu que les concentracions òptimes a utilitzar poden variar al llarg del temps. Si s'analitzen a temps 0 (immediatament post liofilització), s'observa com la viabilitat es manté millor en concentracions baixes de llet d'euga (entre el 5% i el 10% de matèria seca). Si, pel contrari, prenem els valors de temps 90 dies, el rang de concentració idoni és més elevat (entre el 20% i el 25% de matèria seca). Tot sembla

indicar, doncs, que la concentració idònia no és un valor únic, sinó que depèn del moment en el que volem administrar el microorganisme, necessitant d'una major aportació de matèria seca quant major és el temps d'emmagatzemament.

5.1.4. Discussió dels resultats estadístics referents a la capacitat de crioprotecció de la llet d'euga

La valoració de la significació estadística de qualsevol resultat referent al desenvolupament microbià resulta complex degut al comportament de les dades experimentals que s'obtenen. Els bacteris creixen seguint una progressió geomètrica en la qual el nombre d'individus es duplica al cap d'un temps determinat (temps de generació). El comportament invers, és a dir, la pèrdua de viabilitat, sovint té un comportament similar, decreixent de forma logarítmica al llarg del temps.

A l'analitzar les diferències de les dades obtingudes en aquest experiment en valors absoluts, els p-valors resultants no ofereixen una visió ajustada del que succeeix gràficament. Tractar amb nombres molt elevats ($10^{11} - 10^6$), suposa obtenir variàncies molt elevades. Transformant els valors a logaritmes la variància disminueix considerablement, i els valors obtinguts s'acosten més a la realitat mostrada a les figures.

Aquest fet també succeeix quan s'ha d'expressar la pèrdua de la viabilitat en percentatges de reducció. A les Figures 31, 34, 37 i 40 es pot apreciar com aquests tendeixen ràpidament a 100% tot i que els valors dels recomptes no s'aproximen 0 (Figures 30, 33, 36 i 39). Al transformar els valors a logaritmes els percentatges es redueixen i les diferències entre els grups es fan més notòries (Figures 32, 35, 38 i 41).

Si es comparen els resultats obtinguts entre les diferents concentracions de llet d'euga, es pot observar com existeixen diferències estadísticament significatives entre els vials control i els vials amb llet d'euga per a totes les soques assajades en alguna de les concentracions. S'observen diferències entre les dades comparades en valors absoluts i en valors expressats en logaritmes, modificant en certs casos la significació estadística.

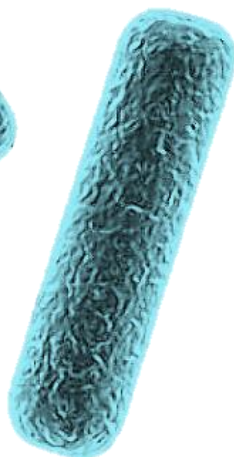
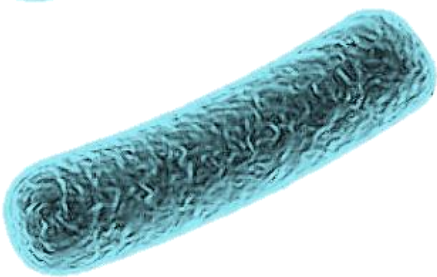
5.1.5. Discussió dels resultats de la conservació de la viabilitat de tres soques de *Lactobacillus plantarum* equines al ser sotmeses al procés de liofilització protegides amb llet d'euga en comparació amb la llet de vaca.

Les Figures 42, 43 i 44 ens mostren com el grau de pèrdua de viabilitat deguda al procés de la liofilització és força similar si s'utilitza llet de vaca o llet d'euga, no observant-se diferències estadísticament significatives (Taula 86). En ambdós casos, s'observa una pèrdua que pot oscil·lar d'una a tres unitats logarítmiques, depenent de la concentració en la que es trobi el crioprotector. Les concentracions de matèria seca que mostren millor capacitat per protegir les tres soques oscil·len entre el 10% i el 20% en el cas de la llet d'euga i entre el 15% i el 20% en la llet de vaca.

5.1.6. Discussió dels resultats referents a la conservació de la viabilitat de *Lactobacillus plantarum* 2 durant 90 dies d'emmagatzemament protegit amb llet d'euga en comparació amb la llet de vaca

La soca *Lactobacillus plantarum* 2 es va protegir paral·lelament en llet descremada vaca al 15% (Taula 87). Les diferències amb la llet d'euga no van ser estadísticament significatives, el que ens indica que, usant un 15% de llet en pols d'euga per la protecció de la soca liofilitzada, s'obtenen resultats comparables als de la llet de vaca.

CONCLUSIONS



Conclusions

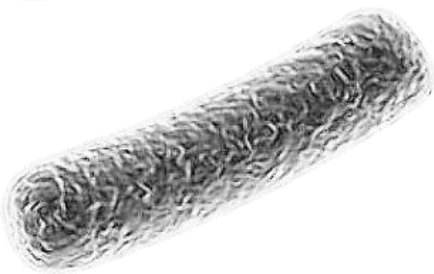
1. Els resultats obtinguts del recomptes microbians de l'anàlisi de 23 llets crues procedents de dues eugues mostren que aquesta és, des del punt de vista microbiològic, apta per al consum humà. Aquesta afirmació es recolza en el fet que totes les mostres han presentat recomptes totals inferiors al $1,5 \times 10^6$ UFC/ mL, límit establert per la legislació europea (Reglament (CE) N° 853/2004).
2. La llet d'euga posseeix un microbioma ampli que es veu modificat, quantitativament i qualitativa, al llarg de la gestació de l'euga. Les condicions de cultiu que permeten una major recuperació de microorganismes de la llet d'euga són: Agar Columbia + 5% de sang de xai, 37°C, 48 hores d'incubació en aerobiosi.
3. La llet d'euga conté una gran varietat d'enzims constitutius detectables mitjançant *kits* comercials miniaturitzats. Aquests enzims presenten una variabilitat quantitativa al llarg de la gestació. Entre els enzims estudiats, els que es troben en major concentració són l'esterasa C4 i la leucina arilamidasa.
4. El perfil enzimàtic de la llet crua mostra variacions qualitatives i quantitatives en funció de l'espècie productora.
5. La caracterització de perfils enzimàtics mitjançant l'ús de *kits* comercials miniaturitzats es confirma com un sistema ràpid, simple, específic i sensible. La seva aplicació en aquest estudi obre noves possibilitats d'ús, permetent el seguiment de les activitats enzimàtiques en certes matrius alimentàries al llarg del temps, valorant la seva estabilitat.

6. De les 11 soques de bacteris àcid làctics aïllats de la llet i femtes d'euga, les que van presentar un potencial ús com a probiòtics per la seva seguretat i resistència *in vitro* a condicions gastrointestinals van ser les anomenades com a *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 2, *Lactobacillus plantarum* 3, *Lactobacillus plantarum* 5 i *Lactococcus brevis* 2.

7. Els bacteris àcid làctics aïllats a la llet i femtes equines posseeixen una capacitat antimicrobiana enfront una gran diversitat de microorganismes indesitjables (alterants i/o patògens). És necessària la realització d'estudis complementaris per a demostrar el seu potencial ús com a biopreservadors. La seva acció antimicrobiana es deu principalment a la formació d'àcids orgànics, però també a la producció de peròxid d'hidrogen i compostos termolàbils. Per altra banda, cal tenir en compte el potencial risc de selecció de soques resistents que pot comportar el seu ús, fet que s'ha pogut evidenciar *in vitro*. De les 11 soques testades, l'anomenada com a *Lactobacillus plantarum* 2 es posiciona com la millor candidata a posteriors assajos, al ser la que mostra major capacitat d'inhibició sense generar resistències detectables mitjançant el test de difusió.

8. La llet d'euga en pols es presenta com una bona alternativa a l'ús de la llet de vaca per a la liofilització de soques de *Lactobacillus* spp. i de *Lactococcus lactis* de procedència equina. A causa de la seva composició, molt similar a la llet materna humana, pot esdevenir un bon excipient per a aliments funcionals o complements alimentaris, especialment aquells destinats a la nutrició infantil i per a persones amb intolerància a la proteïna de la llet de vaca.

BIBLIOGRAFIA



- Acuña, L., Morero, R. D., i Bellomio, A.** (2011). Development of wide-spectrum hybrid bacteriocins for food biopreservation. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 1029-1049.
- Adams, M.** (1999). Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 68(2), 171-178.
- Alais, C.** (1985). *Ciencia de la leche: principios de técnica lechera*. Reverte.
- Allen, W. R.** (2005). Maternal recognition and maintenance of pregnancy in the mare. *Anim. Reprod*, 2(4), 209-223.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., i Chevallier, I.** (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food control*, 17(6), 454-461.
- Amorocho, C. M.** (2011). Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra. Tesi doctoral, Universitat politècnica de València, València, Espanya.
- An, Y., Adachi, Y., i Ogawa, Y.** (2004). Classification of lactic acid bacteria isolated from chigee and mare milk collected in Inner Mongolia. *Animal science journal*, 75(3), 245-252.
- Andersson, D. I.** (2003). Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Current opinion in microbiology*, 6(5), 452-456.
- Auldish, M. J., i Hubble, I. B.** (1998). Effects of mastitis on raw milk and dairy products. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53(1), 28-36.

- Bagnicka, E., Strzalkowska, N., Krzyżewski, J., i Kolataj, A.** (2008). The activity of acid phosphatase and β -N-acetyl-hexosaminidase in raw whole milk of cows as affected by feeding season (autumn/winter vs. spring/summer). *Animal Science Papers and Reports*, 26(1), 49-57.
- Batdorj, B., Dalgalarrrondo, M., Choiset, Y., Pedroche, J., Metro, F., Prévost, H., ... i Haertlé, T.** (2006). Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *Journal of applied microbiology*, 101(4), 837-848.
- Beaz-Hidalgo R, Romalde JL, i Prado S.** (2012) Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas al cultivo de la almeja. Caracterización y patogénesis. *AquaTIC* 36: 1-2.
- Blanco-Brieva, G., de Frutos-Escrig, M. P., Martín, H., Campos-Martin, J. M., i Fierro, J. L.** (2012). Selective decomposition of hydrogen peroxide in the epoxidation effluent of the HPPO process. *Catalysis Today*, 187(1), 168-172.
- Borst, G. H., Smidt, W. J., i Berghuis, G. A.** (1985). Progesterone in mare's milk: suitable for early pregnancy detection?. *Tijdschrift voor diergeneeskunde*, 110(10), 400-401.
- Boss, E. A., Maciel Filho, R., i de Toledo, E. C. V.** (2004). Freeze drying process: real time model and optimization. *Chemical engineering and processing: process intensification*, 43(12), 1475-1485.
- Bostedt, H., Lehmann, B., i Peip, D.** (1987). The problems of mastitis in mares. *Tierärztliche Praxis*, 16(4), 367-371.
- Bouwman, H., i Schee, W.** (1978). Composition and production of milk from Dutch warmblooded saddle horse mares. *Zeitschrift für Tierphysiologie Tierernährung und Futtermittelkunde*, 40(1-6), 39-53.

- Braem, G., De Vlieghe, S., Verbist, B., Heyndrickx, M., Leroy, F., i De Vuyst, L.** (2012). Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity. *Veterinary microbiology*, 157(3), 383-390.
- Businco, L., Giampietro, P. G., Lucenti, P., Lucaroni, F., Pini, C., Di Felice, G., ... i Orlandi, M.** (2000). Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105(5), 1031-1034.
- Byczkowski, J. Z., i Gessner, T.** (1988). Biological role of superoxide ion-radical. *International Journal of Biochemistry*, 20(6), 569-580.
- Cabello, R. R.** (2007). *Microbiología y parasitología humana/Microbiology and Human Parasitology: Bases etiologicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias/ Etiological Basis of Infectious and Parasitic Diseases*. Ed. Médica Panamericana.
- Caja, G., González, E., Flores, C., Carro, M. D., i Albanell, E.** (2003). Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos. *Avances en nutrición y alimentación animal. Fira de Barcelona, España: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal*, 193-214.
- Campbell, A. H.** (1960). The search for new antibiotics. *British medical bulletin*, 16(1), 82-85.
- Cantón, R., Sánchez, J. E. G., Gómez-Lus, M. L., Martínez, L. M., Rodríguez-Avial, C., i Vila, J.** (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica. *Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos en Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Editor Picazo J J.

- Caroprese, M., Albenzio, M., Marino, R., Muscio, A., Zezza, T., i Sevi, A.** (2007). Behavior, milk yield, and milk composition of machine-and hand-milked murgese mares. *Journal of dairy science*, 90(6), 2773-2777.
- Carr, F. J., Chill, D., i Maida, N.** (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*, 28(4), 281-370.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., i Gibbs, P.** (2003). Impedimetric method for estimating the residual activity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *International Dairy Journal*, 13(6), 463-468.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., i Gibbs, P.** (2004). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 14(10), 835-847.
- Cebrián, R., Baños, A., Valdivia, E., Pérez-Pulido, R., Martínez-Bueno, M., i Maqueda, M.** (2012). Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food microbiology*, 30(1), 59-67.
- Chait, R., Shrestha, S., Shah, A. K., Michel, J. B., i Kishony, R.** (2010). A differential drug screen for compounds that select against antibiotic resistance. *PloS one*, 5(12), e15179.
- Chambers, J. V.** (2002). The microbiology of raw milk. *Dairy microbiology handbook*, 3, 39-90.
- Chávez, M. S., Margalef, M. I., i Martínez, M.** (2007). Cuantificación de Lipólisis en Leche Caprina (Saanen) Cruda y Térmicamente Tratada. Recuperat el 16 d'Abril de 21015 de: <http://www.produccion-animal.com.ar>.

- Cheigh, C. I., Choi, H. J., Park, H., Kim, S. B., Kook, M. C., Kim, T. S., ... i Pyun, Y. R.** (2002). Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. *Journal of Biotechnology*, 95(3), 225-235.
- Chiofalo, B., Salimei, E., i Chiofalo, L.** (2001). Ass's milk: exploitation of an alimentary resource. *Riv. Foliuim*, 1(Suppl 3), 235-241.
- Collado, M. C., Isolauri, E., Salminen, S., i Sanz, Y.** (2009). The impact of probiotic on gut health. *Current drug metabolism*, 10(1), 68-78.
- Consulta d'experts sobre greixos i àcids grassos en la nutrició humana.** (2010). *Fats and fatty acids in human nutrition: report of an Expert Consultation*; Gènova, Suècia. Recuperat el 21 de Juliol de 2014 de <http://www.who.int>.
- Corti, A., Franzini, M., Casini, A. F., Paolicchi, A., i Pompella, A.** (2008). Vitamin C supply to bronchial epithelial cells linked to glutathione availability in elf—A role for secreted γ -glutamyltransferase?. *Journal of Cystic Fibrosis*, 7(2), 174-178.
- Crowe, J. H., Carpenter, J. F., i Crowe, L. M.** (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual review of physiology*, 60(1), 73-103.
- Csapó, J., Stefler, J., Martin, T. G., Makray, S., i Csapó-Kiss, Z.** (1995). Composition of mares' colostrum and milk. Fat content, fatty acid composition and vitamin content. *International Dairy Journal*, 5(4), 393-402.
- Csapó-Kiss, Z., Stefler, J., Martin, T. G., Makray, S., i Csapó, J.** (1995). Composition of mares' colostrum and milk. Protein content, amino acid composition and contents of macro and micro-elements. *International Dairy Journal*, 5(4), 403-415.
- Curadi, M. C., Giampietro, P. G., Lucenti, P., i Orlandi, M.** (2001). Use of mare milk in pediatric allergology. *Proc ASPA Congr Recent Progr Anim Prod Sci, Italy*, 2, 647-649.

- Danków, R., Wojtowski, J., Pikul, J., Niżnikowski, R, i Cais-Sokolińska, D.** (2006). Effect of lactation on the hygiene quality and some milk physicochemical traits of the Wielkopolska mares. *Arch. Tierz*, 49, 201-206.
- De Valdez, G. F., de Giori, G. S., de Ruiz Holgado, A. P., i Oliver, G.** (1983). Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze-drying. *Cryobiology*, 20(5), 560-566.
- De Vuyst, L., i Vandamme, E. J.** (1994). *Antimicrobial potential of lactic acid bacteria* (pp. 91-142). Springer US.
- Douglas, H. C.** (1947). Hydrogen peroxide in the metabolism of *Lactobacillus brevis*. *Journal of bacteriology*, 54(2), 272-272.
- Doreau, M., i Boulot, S.** (1989). Recent knowledge on mare milk production: a review. *Livestock Production Science*, 22(3), 213-235.
- Doreau, M., i Martin-Rosset, W.** (2002). Dairy animals: horse. *Encyclopedia of dairy sciences*, 358.
- Doreau, M., i Martuzzi, F.** (2006). Fat content and composition of mare's milk. *Publication-European Association for Animal Production*, 120, 77.
- Drogoul, C., Prevost, H., i Maubois, J. L.** (1992). Le lait de jument, un produit, une filiere a developper?.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F. i Collins, J. K.** (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 386s-392s.
- EFSA-FEEDAP.** (2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J*, 10, 2740-2749.

- El-Agamy, E. I.** (2007). The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research*, 68(1), 64-72.
- El-Kholy, M. S., Halim, H. Y., i Marzouk, A. H.** (1991). Beta-glucuronidase and hyperbilirubinemia in breast-fed versus formula-fed babies. *The Journal of the Egyptian Public Health Association*, 67(3-4), 237-248.
- Ellinger, S., Linscheid, K. P., Jahnecke, S., Goerlich, R., i Enbergs, H.** (2002). The effect of mare's milk consumption on functional elements of phagocytosis of human neutrophil granulocytes from healthy volunteers. *Food and agricultural immunology*, 14(3), 191-200.
- Erginkaya, Z., Ünal, E., i Kalkan, S.** (2014). Microbial Metabolites as Biological Control Agents in Food Safety. In *Food Processing: Strategies for Quality Assessment* (pp. 225-259). Springer New York.
- Eschenbach, D. A., Davick, P. R., Williams, B. L., Klebanoff, S. J., Young-Smith, K., Critchlow, C. M., i Holmes, K. K.** (1989). Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(2), 251-256.
- FAO** (s.d.). *Dairy production and products. Dairy animals*. Recuperat el 8 d'agost de 2014, de <http://www.fao.org>.
- Farkye, N. Y.** (2003). Other enzymes. In *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins* (pp. 571-603). Springer US.
- FEFANA** (2005). *Probiotics in animal nutrition*, 1^a ed. FEFANA. Brussel·les, Bèlgica. Recuperat el 12 de Juny de 2014, de <http://www.fefana.org>.
- Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., i Rodríguez, J. M.** (2013). The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research*, 69(1), 1-10.

- Foekel, C., Schubert, R., Kaatz, M., Schmidt, I., Bauer, A., Hipler, U. C., ... i Jahreis, G.** (2009). Dietetic effects of oral intervention with mare's milk on the Severity Scoring of Atopic Dermatitis, on faecal microbiota and on immunological parameters in patients with atopic dermatitis. *International journal of food sciences and nutrition*, 60(s7), 41-52.
- Fox, P.F.** (2014). Milk: An overview. En *Milk proteins: from expression to food*. (pp. 20 -74). Academic Press.
- Fox, P. F.** (2003a). Milk proteins: general and historical aspects. En *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins* (pp. 1-48). Springer US.
- Fox, P. F.** (2003b). Significance of indigenous enzymes in milk and dairy products. *Food science and Technology*, 255-278.
- Fox, P. F., i Kelly, A. L.** (2006). Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 1. *International Dairy Journal*, 16(6), 500-516.
- Fox, P. F., i McSweeney, P. L.** (1998). *Dairy chemistry and biochemistry*. Springer Science i Business Media.
- Garneau, S., Martin, N. I., i Vederas, J. C.** (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 84(5), 577-592.
- Gibbs, P. G., Potter, G. D., Blake, R. W., i McMullan, W. C.** (1982). Milk production of quarter horse mares during 150 days of lactation. *Journal of animal science*, 54(3), 496-499.
- Girmé, G., Arosemena, E. L., Pérez, L., Vera, R., Grau, E., i Calvo, M. A.** (2014). Enhancement of the viability of *Lactobacillus plantarum* during the preservation and storage process based on the response surface methodology. *Food and Nutrition Sciences*, 5(18), 1746.

- Gobbi, R. M.** (1993). *EUA Patent n° 5750149* Pharmaceutical and democosmetic compositions containing equine colostrum.
- Gollop, N., Zakin, V., i Weinberg, Z. G.** (2005). Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. *Journal of applied microbiology*, 98(3), 662-666.
- Granados Pérez, R., i Villaverde Peris, C.** (2003). *Microbiología Tomo I*. Madrid. España: Thomson Paraninfo.
- Grup de treball conjunt FAO/OMS** (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Ontario, Canada. Recuperat el 21 de Juliol de 2014 de: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics2/en/index.html.
- Gustafson, C. J., Taylor, S. L., i Feldman, S. R.** (2011). Usage of complementary and alternative medicine for management of skin disease. *Journal of Dermatological Treatment*, 22(5), 306-308.
- Haab, W., i Smith, L. M.** (1956). Variations in alkaline phosphatase activity of milk. *Journal of Dairy Science*, 39(12), 1644-1650.
- Hambraeus, L.** (1994). Milk composition in animals and humans: Nutritional aspects. *Dairy Products in Human Health and Nutrition. Rotterdam: Balkema*, 13-23.
- Hansen, J. N., i Sandine, W. E.** (1994). Nisin as a model food preservative. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 34(1), 69-93.
- Hao, Y., Zhao, L., Zhang, H., Zhai, Z., Huang, Y., Liu, X., i Zhang, L.** (2010). Identification of the bacterial biodiversity in koumiss by denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific polymerase chain reaction. *Journal of dairy science*, 93(5), 1926-1933.

- Hayes, M. C., i Boor, K.** (2001). Raw milk and fluid milk products. *Food Science and Technology*, 59-76.
- Heckly, R. J.** (1984). Principles of preserving bacteria by freeze-drying. *Developments in Industrial Microbiology*, 26, 379-395.
- Herreros, M. A., Sandoval, H., González, L., Castro, J. M., Fresno, J. M., i Tornadijo, M. E.** (2005). Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food microbiology*, 22(5), 455-459.
- Hogan, J. S., Smith, K. L., Hoblet, K. H., Schoenberger, P. S., Todhunter, D. A., Hueston, W. D., ... i Conrad, H. R.** (1989). Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. *Journal of Dairy Science*, 72(6), 1547-1556.
- Hoffmann, B., Gentz, F., i Failing, K.** (1996). Investigations into the Course of Progesterone-, Oestrogen-and eCG-concentrations During Normal and Impaired Pregnancy in the Mare. *Reproduction in Domestic Animals*, 31(3), 717-723.
- Hooper, L. V., Littman, D. R., i Macpherson, A. J.** (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336(6086), 1268-1273.
- Huang, L., Lu, Z., Yuan, Y., Lü, F., i Bie, X.** (2006). Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* based on response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 55-61.
- Hubalek, Z.** (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46(3), 205-229.
- Humbert, G., Chang, O., i GAILLARD, J. L.** (2005). Plasmin activity and plasminogen activation in equine milk. *Milchwissenschaft*, 60(2), 134-137.

- Huot, E., Barrena-Gonzalez, C., i Petitedemange, H.** (1996). Comparative effectiveness of nisin and bacteriocin J46 at different pH values. *Letters in applied microbiology*, 22(1), 76-79.
- Huyghebaert, G., Ducatelle, R., i Van Immerseel, F.** (2011). An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *The Veterinary Journal*, 187(2), 182-188.
- Ince, Z., Coban, A., Peker, I., i Can, G.** (1995). Breast milk β -glucuronidase and prolonged jaundice in the neonate. *Acta Paediatrica*, 84(3), 237-239.
- Jensen, R. G., Ferris, A. M., Lammi-Keefe, C. J., i Henderson, R. A.** (1990). Lipids of bovine and human milks: a comparison. *Journal of Dairy Science*, 73(2), 223-240.
- Johnston, R. H., Kamstra, L. D., i Kohler, P. H.** (1970). Mares' milk composition as related to " foal heat" scours. *Journal of animal science*, 31, 549-553.
- Kelly, A. L., i Fox, P. F.** (2006). Indigenous enzymes in milk: A synopsis of future research requirements. *International dairy journal*, 16(6), 707-715.
- Kenny, M., Smidt, H., Mengheri, E., i Miller, B.** (2011). Probiotics—do they have a role in the pig industry?. *Animal*, 5(03), 462-470.
- Khoramnia, A., Abdullah, N., Liew, S. L., Sieo, C. C., Ramasamy, K., i Ho, Y. W.** (2011). Enhancement of viability of a probiotic *Lactobacillus* strain for poultry during freeze-drying and storage using the response surface methodology. *Animal science journal*, 82(1), 127-135.
- Klaenhammer, T. R.** (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 12(1-3), 39-85.
- König, H., i Fröhlich, J.** (2009). Lactic acid bacteria. En *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (pp. 3-29). Springer Berlin Heidelberg.

- Kun, Szilárd** (2008). Scientific and experimental bases of the production of non-dairy probiotic foods Tesi doctoral, University of Budapest, Budapest, Hongria.
- Lash, B. W., Mysliwiec, T. H., i Gourama, H.** (2005). Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). *Food Microbiology*, 22(2), 199-204.
- Li, H., Lu, M., Guo, H., Li, W., i Zhang, H.** (2010). Protective effect of sucrose on the membrane properties of *Lactobacillus casei* Zhang subjected to freeze-drying. *Journal of Food Protection*®, 73(4), 715-719.
- Lomax, A. R., i Calder, P. C.** (2009). Probiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence from studies conducted in humans. *Current pharmaceutical design*, 15(13), 1428-1518.
- Magariños, H.** (2000). Producción higiénica de la leche cruda, una guía para la pequeña y mediana empresa. *Editorial Producción y Servicios Incorporados. GT*, 85.
- Malacarne, M., Martuzzi, F., Summer, A., i Mariani, P.** (2002). Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. *International Dairy Journal*, 12(11), 869-877.
- Malinowski, K., Hallquist, N. A., Helyar, L., Sherman, A. R., & Scanes, C. G.** (1990). Effect of different separation protocols between mares and foals on plasma cortisol and cell-mediated immune response. *Journal of Equine Veterinary Science*, 10(5), 363-368.
- Marconi, E., i Panfili, G.** (1998). Chemical composition and nutritional properties of commercial products of mare milk powder. *Journal of food composition and analysis*, 11(2), 178-187.

- Mariani, P., Summer, A., Martuzzi, F., Formaggioni, P., Sabbioni, A., i Catalano, A. L.** (2001). Physicochemical properties, gross composition, energy value and nitrogen fractions of Haflinger nursing mare milk throughout 6 lactation months. *Animal Research*, 50(5), 415-425.
- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M. L., Xaus, J., Fernández, L. i Rodríguez, J. M.** (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of pediatrics*, 143(6), 754-758.
- Martuzzi, F., Summer, A., Formaggioni, P., i Mariani, P.** (2004). Physico-chemical characteristics, nitrogen composition and mineral elements at the end of lactation. *Ital. J. Anim. Sci*, 3, 293-299.
- Mataragas, M., Drosinos, E. H., i Metaxopoulos, J.** (2003). Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4±2 C. *Food Microbiology*, 20(2), 259-265.
- McCue, P. M., i Wilson, W. D.** (1989). Equine mastitis-a review of 28 cases. *Equine veterinary journal*, 21(5), 351-353.
- Medhammar, E., Wijesinha-Bettoni, R., Stadlmayr, B., Nilsson, E., Charrondiere, U. R., i Burlingame, B.** (2012). Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(3), 445-474.
- Meyrand, M., Guillot, A., Goin, M., Furlan, S., Armalyte, J., Kulakauskas, S., ... i Chapot-Chartier, M. P.** (2013). Surface proteome analysis of a natural isolate of *Lactococcus lactis* reveals the presence of pili able to bind human intestinal epithelial cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(12), 3935-3947.

- Mirрахimov, M. M., Moldotashev, I. K., Tenenbaum, A. M., i Kadyraliev, K. K.** (1986). Experience with the use of natural mare's milk in the combined treatment of refractory heart failure. *Voprosy pitaniia*, (2), 74.
- Montville, T. J., Winkowski, K., i Ludescher, R. D.** (1995). Models and mechanisms for bacteriocin action and application. *International Dairy Journal*, 5(8), 797-814.
- Motta, R. G., Listoni, F. J. P., Ribeiro, M. G., Bussolaro, V. A. P., i Link, A.** (2014). Microbiologic Characterization of Equine Mastitis. *J Bacteriol Parasitol*, 5(186), 2.
- Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P. V., Jain, S., i Yadav, H.** (2012). Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS microbiology letters*, 334(1), 1-15.
- Nagpal, R., Yadav, H., Kumar, M., Jain, S., Yamashiro, Y., i Marotta, F.** (2013). Probiotics, Prebiotics and Synbiotics: An Introduction. *Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health*, 1.
- Neseni, R., Flade, E., Heidler, G., i Steger, H.** (1958). Yield and composition of mare's milk in the course of lactation. *Arch. Tierzucht*, 1, 91-129.
- O'Bryan, C. A., Crandall, P. G., Ricke, S. C., i Ndahetuye, J. B.** (2014). Lactic acid bacteria (LAB) as antimicrobials in food products: types and mechanisms of action. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*, 117.
- Oftedal, O. T., Hintz, H. F., i Schryver, H. F.** (1983). Lactation in the horse: milk composition and intake by foals. *J Nutr*, 113, 2196-2206.
- Orlandi, M., Goracci, J., i Curadi, M. C.** (2003). Fat composition of mare's milk with reference to human nutrition. *Annali della Facoltà di Medicina veterinaria*, 56, 97-106.

- Osthoff, G., Hugo, A., Joubert, C. C., i Swarts, J. C.** (2011). DSC of milk fats from various animals with high levels of medium-chain, unsaturated and polyunsaturated fatty acids. *South African Journal of Chemistry*, 64, 241-250.
- Oxaran, V., Ledue-Clier, F., Dieye, Y., Herry, J. M., Péchoux, C., Meylheuc, T., ... i Piard, J. C.** (2012). Pilus biogenesis in *Lactococcus lactis*: molecular characterization and role in aggregation and biofilm formation. *PLoS One*, 7(12), e50989.
- Palmfeldt, J., Rådström, P., i Hahn-Hägerdal, B.** (2003). Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. *Cryobiology*, 47(1), 21-29.
- Park, Y. W., i Haenlein, G. F.** (Eds.). (2008). *Handbook of milk of non-bovine mammals*. John Wiley i Sons.
- Park, Y. W., Zhang, H., Zhang, B., i Zhang, L.** (2006). Mare milk. *Handbook of milk of non-bovine mammals*, 275-296.
- Parkes, G. C., Sanderson, J. D., i Whelan, K.** (2009). The mechanisms and efficacy of probiotics in the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *The Lancet infectious diseases*, 9(4), 237-244.
- Pătruică, S., i Mot, D.** (2012). The effect of using prebiotic and probiotic products on intestinal micro-flora of the honeybee (*Apis mellifera carpatica*). *Bulletin of entomological research*, 102(06), 619-623.
- Pérez, L. O.** (2014). Evaluación de la microbiota normal de leche de yegua: Aislamiento de cepas potencialmente probióticas. Memòria postdoctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Espanya.
- Piard, J. C., i Desmazeaud, M.** (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Le lait*, 71(5), 525-541.

- Piard, J. C., Muriana, P. M., Desmazeaud, M. J., i Klaenhammer, T. R.** (1992). Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Applied and environmental microbiology*, 58(1), 279-284.
- Pietrzak-Fiećko, R., Tomczyński, R., Świstowska, A., Borejszo, Z., Kokoszko, E., i Smoczyńska, K.** (2009). Effect of mare's breed on the fatty acid composition of milk fat. *Czech Journal of Animal Science*, 54(9), 403-407.
- Pikul, J., i Wójtowski, J.** (2008). Fat and cholesterol content and fatty acid composition of mares' colostrums and milk during five lactation months. *Livestock Science*, 113(2), 285-290.
- Pikul, J., Wójtowski, J., Danków, R., Kuczyńska, B., i Łojek, J.** (2008). Fat content and fatty acids profile of colostrum and milk of primitive Konik horses (*Equus caballus gmelini* Ant.) during six months of lactation. *Journal of dairy research*, 75(03), 302-309.
- Potočnik, K., Gantner, V., Kuterovac, K., i Cividini, A.** (2011). Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species. *Mljekarstvo*, 61(2), 107.
- Prestes, N. C., Langoni, H., i Cordeiro, L. A. V.** (1999). Estudo do leite de éguas sadias ou portadoras de mastite subclínica, pelo teste de Whiteside, análise microbiológica e contagem de células somáticas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 36(3), 144-148.
- Pridmore, R. D., Pittet, A. C., Praplan, F., i Cavadini, C.** (2008). Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-Salmonella activity. *FEMS microbiology letters*, 283(2), 210-215.
- Revira, R. F., i Pons, I. F.** (1999). Calcio, fósforo y magnesio. *Tratado de nutrición*, 217.

- Rieland, E., Hatzipanagiotou, A., Jahnecke, S., i Enbergs, H.** (1998). [Activities of the enzymes LDH, gamma-GT, GOT, GPT and lactoperoxidase in the milk of breeding mares during the course of lactation]. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*, 111(3), 81-89.
- Rodríguez, E., González, B., Gaya, P., Nuñez, M., i Medina, M.** (2000). Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 10(1), 7-15.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., i Mattila-Sandholm, T.** (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*, 84(3), 197-215.
- Sanaa, M., Poutrel, B., Menard, J. L., i Serieys, F.** (1993). Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 76(10), 2891-2898.
- Santos, A. S., i Silvestre, A. M.** (2008). A study of lusitano mare lactation curve with wood's model. *Journal of dairy science*, 91(2), 760-766.
- Scheibl, P., i Zerbe, H.** (2000). Effect of progesterone on the immune system in consideration of bovine placental retention. *DTW. Deutsche tierarztliche Wochenschrift*, 107(6), 221-227.
- Schwab, C., Vogel, R., i Gänzle, M. G.** (2007). Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1. 106 during freeze-drying. *Cryobiology*, 55(2), 108-114.
- Selmer-Olsen, E., Birkeland, S. E., i Sørhaug, T.** (1999). Effect of protective solutes on leakage from and survival of immobilized *Lactobacillus* subjected to drying, storage and rehydration. *Journal of Applied Microbiology*, 87(3), 429-437.
- Shahani, K. M., Harper, W. J., Jensen, R. G., Parry, R. M., i Zittle, C. A.** (1973). Enzymes in bovine milk: a review. *Journal of dairy science*, 56(5), 531-543.

- Sharmanov, T. S. H., Kadyrova, R. K. H., i Salkhanov, B. A.** (1980). Effectiveness of peptic ulcer diet therapy using rations containing whole mare's and camel's milk. *Voprosy pitaniia*, (3), 10-14.
- Sharmanov, T. S. H., Zhangabylov, A. K., i Zhaksylykova, R. D.** (1981). Mechanism of the therapeutic action of whole mare's and camel's milk in chronic hepatitis. *Voprosy pitaniia*, (1), 17-23.
- Sheng, Q., i Fang, X.** (2009). Bioactive components in mare milk. *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*, 195.
- Solaroli, G., Pagliarini, E., i Peri, C.** (1993). Composition and nutritional quality of mare's milk. *Italian Journal of Food Science*, 5(1), 3-10.
- Stiles, M. E.** (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van leeuwenhoek*, 70(2-4), 331-345.
- Stiles, M. E., i Hastings, J. W.** (1991). Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends in Food Science & Technology*, 2, 247-251.
- Tamime, A. Y., Muir, D. D., i Wszolek, M.** (1999). Kefir, koumiss and kishk. *Dairy industries international*, 64(5), 32-33.
- Tejero-Sariñena, S., Barlow, J., Costabile, A., Gibson, G. R., i Rowland, I.** (2012). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*, 18(5), 530-538.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., i Case, C. L.** (2007). *Introducción a la Microbiología*. Ed. Médica Panamericana.
- Trias, R., Bañeras, L., Montesinos, E., i Badosa, E.** (2010). Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International Microbiology*, 11(4), 231-236.

- Tsumagari, S., Higashino, T., Takagi, K., Ohba, S., Satoh, S., i Takeishi, M.** (1991). Changes of plasma concentrations of steroid hormones, prostaglandin F2 alpha-metabolite and pregnant mare serum gonadotropin during pregnancy in thoroughbred mares. *The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science*, 53(5), 797-801.
- Uniacke-Lowe, T., Huppertz, T., i Fox, P. F.** (2010). Equine milk proteins: chemistry, structure and nutritional significance. *International Dairy Journal*, 20(9), 609-629.
- van der Burg, L. J., Muller, I., i Sloet, V. O. O. M.** (2011). Horse milking industry in The Netherlands and Flanders. *Tijdschrift voor diergeneeskunde*, 136(4), 257-261.
- Veerappan, G. R., Betteridge, J., i Young, P. E.** (2012). Probiotics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Current gastroenterology reports*, 14(4), 324-333.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., i Verstraete, W.** (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4), 655-671.
- Vilà, B., Fontgibell, A., Badiola, I., Esteve-Garcia, E., Jiménez, G., Castillo, M., i Brufau, J.** (2009). Reduction of *Salmonella enterica* var. Enteritidis colonization and invasion by *Bacillus cereus* var. toyoi inclusion in poultry feeds. *Poultry science*, 88(5), 975-979.
- Villarreal, M. A., Díaz, S. B., Disalvo, E. A., i Montich, G. G.** (2004). Molecular dynamics simulation study of the interaction of trehalose with lipid membranes. *Langmuir*, 20(18), 7844-7851.
- Walstra, P.** (2013). *Dairy technology: principles of milk properties and processes*. CRC Press.

- Watanabe, K., Fujimoto, J., Sasamoto, M., Dugersuren, J., Tumursuh, T., i Demberel, S.** (2008). Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in Airag and Tarag, traditional fermented milk products of Mongolia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(8), 1313-1325.
- Wells, S., Ferwerda, N., i Timms, L. L.** (2012). Evaluation of Mare Milk Composition/Quality during Lactation. *Animal Industry Report*, 658(1), 51.
- Welsch, U., Buchheim, W., Schumacher, U., Schinko, I., i Patton, S.** (1988). Structural, histochemical and biochemical observations on horse milk-fat-globule membranes and casein micelles. *Histochemistry*, 88(3-6), 357-365.
- Welsh, R. D.** (1984). The significance of *Streptococcus zooepidemicus* in the horse. *Equine practice* (6), 6-16.
- World Health Organization (WHO).** (2008). Fats and fatty acids in human nutrition: report of an expert consultation. *FAO Food and Nutrition Paper, Geneva, Switzerland*, 3.
- Wiederschain, G. Y., i Newburg, D. S.** (1995). Human milk fucosyltransferase and α -L-fucosidase activities change during the course of lactation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 6(11), 582-587.
- Wohlt, J. E., Clark, J. H., Derrig, R. G., i Davis, C. L.** (1977). Valine, leucine, and isoleucine metabolism by lactating bovine mammary tissue. *Journal of dairy science*, 60(12), 1875-1882.
- Wright S.** (2009). Homogeneity and Stability of Nutritional Premixes. Recuperat el 21 de Juliol de 2014 de: [www.naturalproductsinsider.com/articles /2009/ 07/ homogeneity-and-stability - of- nutritional-premixes.aspx](http://www.naturalproductsinsider.com/articles/2009/07/homogeneity-and-stability-of-nutritional-premixes.aspx)
- Wright, A. V.** (2005). Regulating the safety of probiotics-The European approach. *Current pharmaceutical design*, 11(1), 17-23.

- Wu, R., Wang, L., Wang, J., Li, H., Menghe, B., Wu, J., ... i Zhang, H.** (2009). Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in Inner Mongolia. *Journal of basic microbiology*, 49(3), 318-326.
- Yang, Z.** (2000). *Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties*. Z. Yang.
- Zhangabylov, A. K., i Salkhanov, B. A.** (1976). Use of whole mare's milk in the treatment of peptic ulcer of the stomach and duodenum. *Voprosy pitaniia*, (3), 52-54.
- Zollmann, H.** (1985). Mare's milk. *Electoral Stud Farm Publ. Waldbrunn-Muelben, Germany*, 8.