

PROTEÓLISIS DE LA LECHE CRUDA ALMACENADA EN FRÍO. EFECTO DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS SOBRE LA INTEGRIDAD DE LAS CASEÍNAS

Proteolysis During Cold Storage of Refrigerated Raw Milk. Effect of Proteolytic Enzymes on Casein Integrity

Lourdes Guerrero, Sol Román y Lidis Pacheco

Laboratorio de Productos Lácteos, Núcleo Universitario "Rafael Rangel", Universidad de Los Andes. Trujillo, Venezuela.

RESUMEN

Con la finalidad de evaluar el efecto de las enzimas proteolíticas sobre la integridad de las caseínas, se midió la proteólisis cualitativa y cuantitativamente. Para ello se seleccionaron cuatro industrias lácteas ubicadas en los estados Zulia, Trujillo y Mérida. Se tomaron un total de 107 muestras de leche cruda almacenada en silos a temperatura de refrigeración, las mismas fueron procesadas para realizar análisis químicos y microbiológicos. Se discuten los resultados a la luz de los análisis de los perfiles electroforéticos, método de Hull, recuentos de bacterias psicrótrofas y proteolíticas. Los datos fueron procesados mediante análisis de varianza con procedimientos del SAS. Los resultados mostraron que la leche cruda presentaba una buena calidad química, no así su calidad higiénica. En general, no se observó proteólisis de las caseínas por la técnica de la electroforesis a pesar de encontrarse recuentos de bacterias psicrótrofas entre 10^6 y 10^7 UFC/mL. Sin embargo, los resultados de la prueba de Hull revelaron que las leches crudas almacenadas en frío por más de dos días presentaron una moderada actividad proteolítica. Por lo tanto, se recomienda que aquellas leches con alto contenido de bacterias psicrótrofas no deberían ser almacenadas en frío por más de dos días, cuando las mismas van a ser utilizadas para la elaboración de queso.

Palabras clave: Leche, proteólisis, bacterias psicrótrofas, enzimas proteolíticas, caseínas.

ABSTRACT

In order to evaluate the effect of proteolytic enzymes on casein integrity, qualitative and quantitative proteolysis were measured. Four dairy industries located at Zulia, Trujillo and Mérida states were selected. A total of 107 samples of raw milk, stored

under refrigeration in bulk tanks, were collected and processed by chemical and microbiological analysis. On the basis of electrophoretic profiles, the Hull method, psychrotrophic bacteria and proteolytic psychrotrophic bacteria count analysis, results are discussed. Data were processed by analysis of variance with SAS procedure. Results showed a good chemical quality, but not hygienic quality in raw milk. No proteolysis of caseins was observed with the electrophoresis method, in spite of the fact that psychrotrophic bacteria counts were found to be between 10^6 - 10^7 UFC/mL. However, results of the Hull method showed that refrigerated raw milk stored for two days or more produced moderate proteolytic activity. It is suggested that raw milk with high numbers of psychrotrophics bacterias should not be stored under refrigeration more than two days, before processing it for cheese.

Key words: Milk, proteolysis, psychrotrophic bacteria, proteolytic enzymes, caseins.

INTRODUCCIÓN

La Proteólisis en la leche tiene dos orígenes: el primero mediante los microorganismos que pueden secretar proteasas exógenas resistentes al calor y muchas de ellas se desarrollan durante el almacenamiento en frío de la leche [10]; el segundo está relacionado con el deterioro de la ubre enferma lo que incrementa la cantidad de proteasas endógenas, especialmente aquellas del sistema plasmina-plasminógeno [21].

Gebre-Egziabher y col. [13] señalan que las proteasas de la leche cruda (enzimas exógenas) son producidas por bacterias psicrótrofas, en especial del género *Pseudomonas*. Estos microorganismos pueden crecer con facilidad a temperatura de refrigeración y son eliminados con temperatura de pasteurización, pero muchas especies producen enzimas extracelulares termoresistentes hacia el final del crecimiento exponen-

cial o en fase de crecimiento estacionaria. Martín-Hernández [22] señala que la influencia que tienen estas enzimas sobre las características organolépticas de la leche y productos lácteos, es muy superior en muchos casos a la que pueden ejercer las enzimas nativas de la leche. Las caseínas de la leche están sometidas a la acción de estas enzimas proteolíticas, las cuales causan desestabilización de las micelas de caseínas, hidrolizando más rápidamente a la κ -caseína (κ -CN) en una acción similar a la quimosina del cuajo de ternera. La β -caseína (β -CN) es degradada en menor proporción que la κ -CN y las α s1-caseína (α s1-CN) y las α s2-caseína (α s2-CN) prácticamente no sufren alteración, según lo refieren algunos autores [1, 13].

Respecto a las enzimas endógenas, Martín-Hernández [22], Barbano [6] y Ballou y col. [5] reportan que en la leche cruda la más importante es la proteasa alcalina análoga a la plasmina del suero sanguíneo. La plasmina presente en la leche está como plasminógeno precursor inactivo y la presencia de las células somáticas en una concentración 500.000 cel/mL resulta en la conversión de cantidades significativas de plasminógeno en plasmina, incrementándose la proteólisis de las caseínas. La plasmina actúa fundamentalmente sobre la β -CN, las α s2-CN y α s1-CN siendo éste el orden de susceptibilidad, mientras que la κ -CN es resistente. La acción sobre la β -CN conduce a la formación de las γ 1, γ 2 y γ 3 caseína.

La proteólisis puede causar en la leche principalmente dos problemas: un decrecimiento en el rendimiento quesero [21] y un deterioro en la composición y calidad del queso, sabor amargo en los productos lácteos procesados, tales como quesos, leche procesada a ultra alta temperatura (UAT) y leche pasteurizada [14, 21].

Con la finalidad de estudiar el efecto entre las proteasas exógenas y endógenas presentes en la leche cruda y la proteólisis de las caseínas, se analizaron muestras de leche cruda almacenada a temperatura de refrigeración en silos de 4 Industrias Lácteas ubicadas en la zona baja del estado Trujillo. La leche fue procesada para realizar análisis químicos, microbiológicos y actividad proteolítica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Se recolectaron un total de 107 muestras de leche cruda refrigerada de cuatro industrias localizadas en los municipios Sucre, Candelaria y Tulio Febres correspondientes a los estados Zulia, Trujillo y Mérida, respectivamente. La frecuencia de muestreo fue quincenal, durante un año. Las muestras de leche fueron recolectadas los días Lunes antes de iniciarse el procesamiento de la misma, transportadas bajo condiciones de refrigeración hasta el laboratorio de Productos Lácteos del Núcleo Universitario "Rafael Rangel". Las características más importantes de las industrias se señalan en la TABLA I.

Análisis Químico

Porcentaje de Caseína (CN): La CN se determinó por doble titulación con formaldehído (acidimetría) de acuerdo al método de Sorensen, recomendado por Boscán [7].

Actividad proteolítica Total (APT): La APT fue medida de acuerdo al método de Hull, utilizando el reactivo de Follin Ciocalteau. Se preparó una curva estándar con tirosina y la actividad fue expresada como miligramos de Tirosina por mililitro (mg Tir/mL) [17]. Núñez y Núñez [24] señalan que este método cuantifica la acción acumulada de las proteasas de los psicrótrofos y de las otras bacterias.

Análisis Microbiológico

Recuento de Bacterias Psicrótrofas Totales (RPT): El RPT se realizó siguiendo la técnica de la Norma FIL- IDF 101 A: [11]. Las diluciones de las muestras se sembraron en Agar Estándar y se incubaron a $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 días. El resultado se expresó en UFC/mL.

Recuento de Bacterias Psicrótrofas Proteolíticas (RPP): El recuento de bacterias psicrótrofas proteolíticas se realizó siguiendo el procedimiento de APHA [4]. Las diluciones se sembraron en Agar Leche y se incubaron a $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 días. El resultado se expresó en UFC/mL.

TABLA I
CARACTERÍSTICAS DE LAS INDUSTRIAS LÁCTEAS*

Industria	Municipio/ Estado	Volumen de leche recibida L/día	Número de silos y temperatura de almacen.	Volumen de leche para queso	Tipo de queso	Tiempo de Almacene. (días)
1	Sucre/Zulia	170.000	5 / 4-6 °C	170.000	Madurado	2-3
2	Candelaria/Trujillo	138.000	7 / 4 °C	138.000	Madurado y Fresco	2-3
3	Sucre/Zulia	49.000	1 / 4 °C	28.000	Fresco	<1
4	T.Febres/Mérida	135.000	1 / <4 °C	30.000	Fresco	2

* Información Suministrada por las Industrias.

Recuento de células somáticas (RCST): El RCST se realizó de acuerdo a la técnica descrita Norma FIL-IDF 148 A: [12]. Los extendidos de leche se colorearon con el colorante Broadhurst-Paley recomendado por Shalm y col. [26]. Para la cuantificación del conteo celular al microscopio se utilizó un factor de corrección para el equipo. Los resultados se expresaron como recuento de células somáticas totales por ml (RCST/mL).

Electroforesis Vertical de las Caseínas: Para separar las caseínas se precipitó la leche a pH 4,4 con Ácido Acético concentrado mediante goteo lento, se agitó por 30 min y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min. El precipitado se resuspendió en una solución de úrea 9M+ β -mercaptoetanol 1% y se llevó a pH 7,0 con NaOH 1N. La dilución de las muestras se efectuó con agua bidestilada y solución desnaturizante (úrea-tris- β -mercaptoetanol-azul de bromofenol), se sembraron 15 μ L de las mismas en los geles verticales [15].

La electroforesis vertical (UREA-PAGE) se realizó en un equipo Bio-Rad Miniprotean. La migración se efectuó sobre geles discontinuos con 5% poliacrilamida-0,3% bisacrilamida-4,5M úrea. Se utilizó tris-glicina como buffer de migración ajustado a pH 8,9. La migración duró aproximadamente 45 min. A 30 mA/gel. Las proteínas se fijaron con ácido tricloroacético 12%, se colorearon con azul de Coomassie R250 y decoloraron con una mezcla de metanol-ácido-acético-glicerol (20:5:3) [3].

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza utilizando el procedimiento del Modelo Lineal General del paquete estadístico SAS [27], bajo el ambiente UNIX para red, para IBM RS6000, instalada en CECALCULA (Centro Nacional de Cálculo) ULA. Cuando se apreciaron diferencias significativas entre las medias, éstas fueron separadas mediante la prueba de comparación múltiple de Duncan ($P < 0,05$). Adicionalmente, se establecieron correlaciones entre las variables evaluadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores estimados de la media, desviación estándar, mínimo y máximo de la CN, APT, RCST, RPT, y RPP, están indicados en la TABLA II.

La calidad higiénica, se determinó por el análisis de algunos parámetros indicadores como lo son el recuento microbiológico de psicrótofos totales y psicrótofos proteolíticos. Las muestras presentaron valores de $1,1 \times 10^7$ UFC/mL (7,06 log UFC/mL) para RPT y de $3,5 \times 10^5$ UFC/mL (5,56 log UFC/mL) para RPP. Guinot-Thomas y col. [16] reportan que el contenido de bacterias psicrótofas en la leche cruda se considera como el parámetro más importante que influye en el comportamiento de la leche durante el almacenamiento. Una leche con una buena calidad microbiológica puede ser almacenada a 4°C durante 48 horas sin que se originen cambios en la composición físicoquímica, éste almacenamiento permite un incremento en la flora psicrótrófica, lo cual incrementará la proteólisis de las caseínas de la leche. En la TABLA II, se observa que las diferentes industrias con leches almacenadas entre 2 y 3 días (1,2 y 4) presentaron valores elevados de estos microorganismos (RPT y RPP). Sin embargo, los resultados no se correlacionan con lo expresado por la Industria 3, la cual no almacena la leche cruda. Por lo tanto, estas contradicciones permiten inferir que provienen de leches crudas con una calidad higiénica deficiente, es decir, con una contaminación inicial elevada, que las hace inadecuadas para ser almacenadas a temperatura de refrigeración y utilizadas para elaboración de quesos, lo mismo sería válido para la elaboración de leche UAT.

En relación a la calidad sanitaria medida por el RCST sólo el 24% presentó valores $> 400 \times 10^3$, umbral indicativo de infección mastítica. Según la clasificación de Philpot citado por Contreras [9], las leches almacenadas en los silos están en la categoría de leches mezcla sin infección mastítica, con una buena calidad sanitaria. Las muestras analizadas abarcan un

TABLA II
PROMEDIOS Y DESVIACIONES ESTÁNDAR DE PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA LECHE CRUDA REFRIGERADA

Parámetro	Industria				Promedio
	1	2	3	4	
Caseína (%)	2,61 \pm 0,16	2,63 \pm 0,19	2,45 \pm 0,27	2,48 \pm 0,20	2,54 \pm 0,09
APT (mg Tirosina/mL)	0,177 \pm 0,02 ^a	0,191 \pm 0,02 ^a	0,140 \pm 0,03 ^b	0,168 \pm 0,05 ^a	0,17 \pm 0,02
RPT (log UFC/mL)	7,30 \pm 0,21	7,23 \pm 0,23	6,95 \pm 0,23	6,78 \pm 0,22	7,06 \pm 0,24
RPP (log UFC/mL)	5,79 \pm 0,26	5,86 \pm 0,27	5,41 \pm 0,32	5,16 \pm 0,31	5,56 \pm 0,31
RCST (log cel/mL)	5,42 \pm 0,22	5,52 \pm 0,24	5,56 \pm 0,22	5,59 \pm 0,22	5,52 \pm 0,22

APT= actividad proteolítica total. RPT= recuento de psicrótofos totales. RPP= recuento de psicrótofos proteolíticos. RCST= recuento de células somáticas. a,b: medias con diferentes superíndices y en una fila difieren significativamente ($P < 0,05$).

amplio rango que va desde 82×10^3 hasta 882×10^3 cel/mL, con una media de 331×10^3 cel/mL ($5,52 \log$ cel/mL) superior al de $5,43 \log$ cel/mL reportado por Ballou y col. [5].

La FIG. 1 (a, b, c) muestran los perfiles electroforéticos seleccionados como representativos del resto. Se determinó el origen de las bandas por comparación de su movilidad con las fracciones de caseínas nativas purificadas según bibliografía [8, 23]. De las cuatro caseínas principales de la leche (α s1-CN, α s2-CN, β -CN, κ -CN), tres son fácilmente identificables, las bandas se observan desde la siembra hasta el ánodo y en orden de aparición la κ -CN, β -CN y α s1-CN.

Para facilitar la interpretación de los resultados y orientar la discusión de los hallazgos obtenidos por otros autores se revisa, por una parte la actividad de las enzimas exógenas y por otra la actividad de las endógenas sobre las caseínas de la leche cruda almacenada en frío.

En relación con el efecto de las enzimas exógenas, no se observó proteólisis principalmente de la κ -CN a pesar de encontrarse el RPT entre 10^6 y 10^7 UFC /mL (FIG. 1 a, b, c).

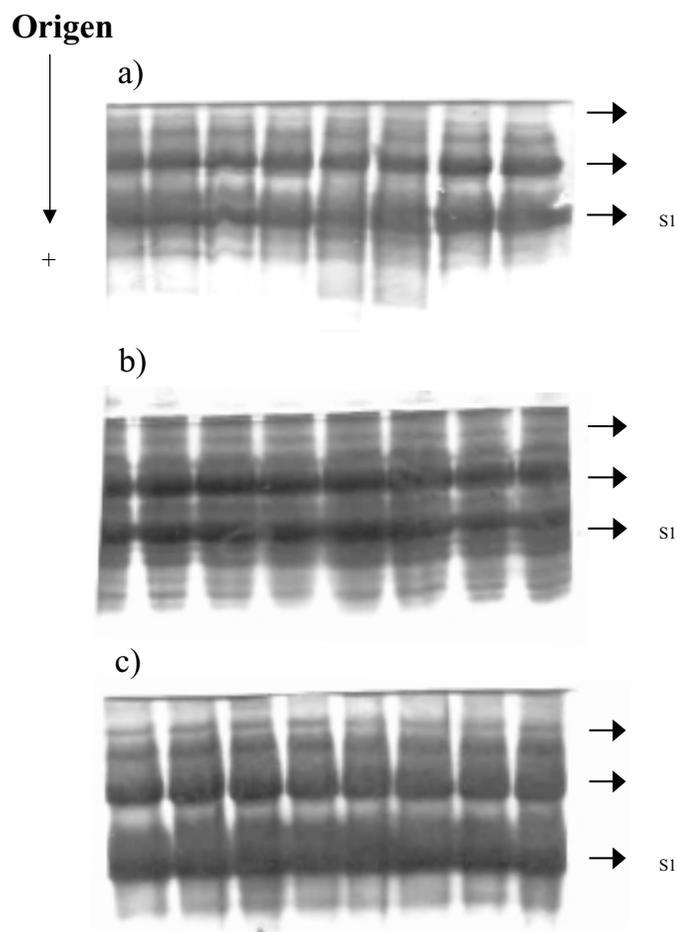


FIGURA 1. ELECTROFORESIS VERTICAL DE MUESTRAS DE LECHE CRUDA ALMACENADAS EN FRÍO. a) INDUSTRIAS 3 y 4, b) INDUSTRIA 2, c) INDUSTRIA 1.

Punch y col., citado por Shah [25] y Guinot-Thomas y col. [16] señalan que son necesarios niveles $>5 \times 10^6$ y 10^7 UFC/mL de bacterias psicrótrofas para que ocurra proteólisis y cambios organolépticos, respectivamente. Sin embargo, Law [20] encontró muy poca hidrólisis de la κ y β -caseína en PAGE a pesar de crecer psicrótrofos proteolíticos en el orden de 10^7 UFC/mL, en leches almacenadas por 72 horas a $7,5^\circ\text{C}$. Otros como, Shelly y Deeth; Griffiths; Rowe citados por Guinot-Thomas y col. [16] señalan que la no proteólisis puede ser debida a lo no excreción de las proteinasas por encontrarse las bacterias todavía en fase exponencial de crecimiento, a niveles de 10^6 UFC/mL, o que solamente una pequeña proporción de estos psicrótrofos son caseinolíticos [20]. Investigadores citados por McKellar y revisados por Allocati [2] sugieren que el número de bacterias no es tan importante como el género de las mismas y las especies dentro del género. Tomando en consideración las opiniones referida por otros autores se sugiere que los resultados obtenidos en este trabajo puedan ser explicados si se considera que la cepa y su fenotipo metabólico pueden influir en la actividad enzimática.

Respecto a la actividad de las enzimas endógenas sobre las caseínas, no fue posible observar diferencias en intensidad de las bandas principales de la β -CN (FIG. 1 a, b, c), probablemente debido al bajo número de células somáticas encontradas ($3,3 \times 10^5$ cel/mL), el cual no fue suficiente para producir proteólisis. Resultados similares fueron reportados por Allocati [2] en leche crudas almacenadas en frío con valores de recuento de células somáticas entre $4,7 \times 10^4$ y $1,7 \times 10^6$ cel/mL. Klei, y col. [19] consideran que valores de RCST de 870×10^3 , están asociados con una elevada actividad proteolítica causando una elevada pérdida de las proteínas en el suero y agua de lavado.

Para determinar el grado de hidrólisis de las proteínas de la leche se utilizó la técnica de Hull. En la TABLA II y FIG. 2, se puede observar que la industria 3 que reporta no almacenamiento de la leche cruda, presentó los valores más bajos de APT medida como mg tirosina/ml, en comparación con las industrias 1, 2 y 4 que almacenan en frío por dos o más

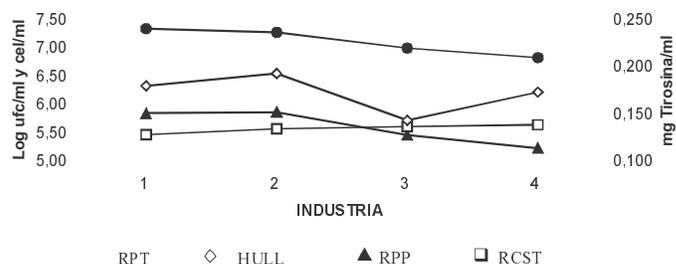


FIGURA 2. VALORES PROMEDIOS DE BACTERIAS PSICRÓTROFAS TOTALES (RPT), PSICRÓTROFAS PROTEOLÍTICAS (RPP), CÉLULAS SOMÁTICAS (RCST) Y ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA (HULL).

días. Es importante señalar que en las muestras de leche analizadas el 93% de las bacterias presentes fueron del tipo psicrótrofas. Por lo tanto, se puede inferir que la degradación puesta en evidencia por ésta técnica se debió principalmente a la presencia de las enzimas producidas por estas bacterias. Jaspe y San José [18] reportan actividad proteasa medida como mmol de tirosina/ml de muestra /hora cuando los valores de Pseudomonas alcanzan valores de 10^8 UFC/mL con 70 horas de incubación. Senyk y col. [28] muestran que la proteólisis medida a través de niveles de tirosina aumenta con el incremento de células somáticas. Se puede señalar que leches crudas almacenadas en frío por más de dos días, presentaron una moderada actividad proteolítica, según lo refieren los valores de mgTir./mL de la TABLA II.

Análisis Multivariante

Con la finalidad de obtener más información sobre la relaciones existentes entre los diferentes parámetros utilizados, se realizó un análisis de correlación. Los resultados se muestran en la TABLA III.

El RPT resultó altamente correlacionado con RPP y RCST. Villar y col. [29] señalan que cuando existe una alta correlación entre estos dos parámetros, la vida útil de éste tipo de leches y sus productos puede ser muy corta, estos mismos autores muestran una correlación menor ($r=0,81$) a la reportada en este trabajo. Ballou y col. [5] encontraron una asociación significativa entre RPT y RCST y sugieren el estudio de la asociación entre estos dos parámetros para el aseguramiento de la calidad de la leche y consideran que debería ser incluida en los programas de HACCP de las haciendas. La proteólisis medida como APT arrojó una baja correlación entre las bacterias y las células somáticas, lo cual confirma lo señalado anteriormente respecto a composición de la flora psicrótrofa presencia de bacterias no muy caseinolíticas RCST muy bajos y/o que las bacterias se encontraban todavía en fase exponencial de crecimiento y por tal motivo no tuvieron el tiempo suficiente para la excreción de las enzimas. Por otro lado, se encontró una alta correlación entre la CN con RPT, RCST y la APT indi-

cando probablemente la asociación entre estos parámetros y la degradación de las caseínas.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIÓN

La calidad higiénica de la leche cruda almacenada en frío fue deficiente, lo cual las hace inadecuadas para ser utilizadas en la elaboración de quesos y leches procesadas UAT.

La calidad sanitaria es aceptable y se pueden considerar como leches mezclas sin infección mastítica.

No se observó proteólisis de las caseínas, por la técnica de la electroforesis, a pesar de que las leches almacenadas en los silos de las industrias presentaron elevados RPT, RPP.

Se observó que la leche almacenada por 2-3 días en frío presentaron una moderada actividad proteolítica.

Se recomienda hacer un estudio que permita identificar las especies dentro del género de las bacterias psicrótrofas proteolíticas encontradas en las leches almacenadas en frío, así como sus condiciones metabólicas.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de los Andes (CDCHT) por el aporte financiero otorgado al proyecto C-232-98-03-A.

Al Centro Nacional de Cálculo de la Universidad de los Andes (CECALCULA) por el tratamiento estadístico de los datos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADAMS, D.; BARACH, J.; SPECK, M. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk protein to ultrahigh temperatura treatment. **J. Dairy Sci.** 59(5):823-827. 1976.
- [2] ALLOCATI, P. Proteolisis en leche cruda y procesada. Universidad de Buenos Aires. Tesis de Maestría, Argentina. 78 pp. 1999.
- [3] ANDREWS, A. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. **J. Dairy Res.** 50:45-55. 1983.
- [4] American Public Health Association. (APHA). **Standard methods for the examination of dairy products.** 16 th edition. 271-278 pp.1992.
- [5] BALLOU, L.; PASQUINI, M.; BREMEL, R.; EVERSON, T.; BOMMER, D. Factors affecting herd milk composition and milk plasmin at four levels of somatic cell counts. **J. Dairy Sci.** 78:2186-2195. 1995.
- [6] BARBANO, D. Influence of mastitis on cheese yield. **Proceeding of the IDF seminar on cheese yield and factors affecting its control.** IDF. Belgium. 48-54p. 1993.

TABLA III
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE PEARSON
ENTRE EL CONTAJE MICROBIOLÓGICO,
ACTIVIDAD PRTOEOLÍTICA TOTAL Y CASEÍNA

	RPT	RPP	RCST	APT	CN
RPT	1,0				
RPP	0,99	1,0			
RCST	0,89	0,82	1,0		
APT	0,57	0,59	-0,45	1,0	
CN	0,88	0,90	-0,73	0,88	1,0

RPT= recuento de psicrótofos totales. RPP= recuento de psicrótofos proteolíticos. RCST= recuento de células somáticas. APT= actividad proteolítica total. CN= caseína.

- [7] BOSCAN, L. **Manual de trabajos prácticos de la Industria Láctea**. Universidad Simón Bolívar Caracas. Capítulo 5:12-13 pp. 1986.
- [8] COLLIN, J.; BERDAGUE, J.; DOGNIN-BERGERET, M.; GRAPPIN, R. Affinage et qualité du Gruyère de Comté IV. Etude de la protéolyse. **Le Lait**. 67(3):299-318. 1987.
- [9] CONTRERAS, J. **Enfermedades de los Bovinos**. Primera Edición. Impresos Rapilet. Barquisimeto. Venezuela. 742 pp.1992.
- [10] FAIRBAIRN, D.; LAW, B. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **J. Dairy Res.** 53:139-177. 1986.
- [11] Federation Internationale de Laitere. FIL-IDF. 101 A:1991. **Enumeration of psychrotrophic microorganisms colony count technique at 6.5°C**. Bélgica. 1-3p. 1991.
- [12] Federation Internationale de Laitere. FIL-IDF. 148 A:1995. **Milk Enumeration of Somatic cells: microscope method**. Bélgica. 1-8 p. 1995.
- [13] GEBRE-EGZIABHER, A.; HUMBERT, E.; BLANK-ENAGEL, G. Hydrolysis of milk proteins by microbial enzymes. **J. Food Prot.** 43(9):709-712. 1980.
- [14] GRANDISON, A.; FORD, G. Effects of variations in somatic cell count on the rennet coagulations properties of milk and on the yield, composition and quality of cheddar cheese. **J. Dairy R.** 53:645-655. 1986.
- [15] GRIPON, J.; DESMAZEUD, M.; LE BARS, D.; BERGER, J. Etude du role des micro-organismes et des enzymes an cours de la maturation des fromages.II. Influence de la présure commerciales **Lait** 55:502-516. 1975.
- [16] GUINOT-THOMAS, P.; AMMOURY, M.; LAURENT, E. Effects of storage conditions on the composition of raw milk. **Int. Dairy J.** 5:211-223. 1995.
- [17] HULL, M. Studies on milk proteins II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. **J. Dairy Sci.** 30:881-884. 1947.
- [18] JASPE, A.; SANJOSE, C. Extracellular enzyme production by *Pseudomonas fluorescens* in homogenized cold milk. **Milchwissenschaft** 54(9):493- 495. 1993.
- [19] KLEI, L.; YUN, J.; SAPRU, A.; LYNCH, J.; BARBANO, D.; SEARS, P.; GALTON, D. Effects of milk somatic cell count on cottage cheese yield and quality. **J.Dairy Sci.** 81:1205-1213. 1998.
- [20] LAW, B. Reviews of the progress of dairy science. Enzymes of psychrotropic bacterias and their effects on milk and milk products. **J. Dairy Res.** 46:573-588.1979.
- [21] LE ROUX, Y.; COLIN, O.; LAURENT, F. Proteolysis in samples of quarter milk with somatic cell counts. 1. Comparison of somatic indicators of endogeneous proteolysis in milk. **J. Dairy Sci.** 78:1289-1297. 1995
- [22] MARTIN-HERNANDEZ, M. Proteasas y lipasas de la leche. Enzimas termorresistentes de bacterias psicrótrofas y su efecto en leche y productos lácteos. **Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.** 31(1): 1-14. 1991
- [23] MUSET, G.; LAYA, E.; MONTERO, H. Studio Della maturazione di un tipo di formaggio Pategras Argentino. II. Evoluzione delle frazione caseiniche. **Sci. Tec. Latt-Cas.** 58(6):561-573. 1987
- [24] NUÑEZ, M.; NUÑEZ, J. Proteasas de psicrótrofos gram negativos. Efecto sobre la leche y los productos lácteos. **Rev. Española de Lactología.** 130:251-260. 1985
- [25] SHAH, N. Psychrotrops in milk: a review. **Milchwissenschaft** 49:423-437. 1994.
- [26] SHALM, O.; CARROLL, E.; JAIN, N. **Bovine Mastitis**. Chapter 6. Lea y Febiger. Philadelphia: 94-157. 1971.
- [27] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). User's guide Statistic. Inc. Cary, NC versión 8,1. 2001.
- [28] SENYK, G.; BARBANO, D.; SHIPE, W. Proteolysis in milk associated with increasing somatic cell counts. **J. Dairy Sci.** 68:2189-2194. 1985.
- [29] VILLAR, A.; GARCÍA, F.; IGLESIAS, L.; GARCÍA, M.; OTERO, A. Application of principal component analysis to the study of microbial populations in refrigerated raw milk from farms. **Int. Dairy J.** 6:937-945. 1996.