

ACTIVIDAD PROTEOLITICA DEL EXTRACTO DE LA FLOR DEL CARDO  
*CYNARA HUMILIS L.\**

(PROTEOLYTIC ACTIVITY OF THE EXTRACT FROM THE FLOWERS OF  
*CYNARA HUMILIS L.*)

por

ELENA SERRANO y A. MARCOS

Departamento de tecnología y bioquímica de los alimentos, Facultad de veterinaria,  
Universidad de Córdoba (España).

*Resumen.*

Por electroforesis cuantitativa en gel de poliacrilamida se ha evaluado la actividad proteolítica de la renina cristalina y del extracto de la flor del cardo *Cynara humilis L.* sobre soluciones de caseinato sódico ovino.

A igual actividad coagulante el cuajo vegetal mostró una actividad proteolítica mucho mayor que la de la renina, siendo sus productos de hidrólisis insolubles más numerosos y de distinta naturaleza que los de la renina.

La velocidad de hidrólisis de la beta-caseína por el cuajo vegetal fue algo mayor que la de la alfa<sub>s</sub>-caseína.

No se ha podido precisar con claridad la influencia del cloruro sódico en la hidrólisis relativa de las caseínas por el cuajo vegetal, aunque parece afectar poco a la proteólisis de la alfa<sub>s</sub>-caseína e inhibir parcialmente la degradación de la beta-caseína.

*Summary.*

The proteolytic activities of chrySTALLINE rennin and the milk clotting enzyme found in the flowers of the cardoon *Cynara humilis L.*, on solutions of ovine sodium caseinate, were investigated by quantitative PAGE.

The plant coagulant was much more proteolytic than renning relative to their clotting activity and yield more insoluble degradation products. The nature of proteolysis products produced by both enzymes was also different.

---

\* Resumen de la tesis de licenciatura realizada por Elena Serrano, bajo la dirección del Profesor Dr. A. Marcos.

Recibido para publicación el 14-12-1979.

The rate of proteolysis of beta-casein by the plant coagulant was slightly greater than that of alpha<sub>s</sub>-casein.

The influence of NaCl on the relative susceptibility of alpha<sub>s</sub>- and beta-casein was not very clear but it would appear that the susceptibility of alpha<sub>s</sub>-casein to proteolysis was not significantly affected by the salt while the proteolysis of beta-casein was reduced.

### *Introducción.*

La carestía y alto precio del cuajo de ternero han estimulado recientemente la búsqueda de otros coagulantes de la leche capaces de sustituirle adecuadamente (Gren, 1977). En la península Ibérica se ha usado tradicionalmente como substitutivo del cuajo de ternero para la elaboración artesanal de quesos de oveja, el extracto de la maceración de pétalos desecados de la flor de cardos del género *Cynara* (Vieira de Sa y Barbosa, 1972; Anónimo, 1973).

Vieira de Sa y Barbosa (1972) investigaron la actividad coagulante y proteolítica del extracto del cardo *C. cardunculus* y su empleo en quesería y concluyeron que el cuajo vegetal es preferible al animal, para fabricar quesos con leche de oveja. Posteriormente se ha investigado su posible utilización en la fabricación de otros tipos de queso (Barbosa *et al.*, 1976).

Además del citado cardo, en nuestro país se emplean, en la elaboración casera de quesos de oveja, extractos de cardos silvestres, principalmente el *C. humilis* (Anónimo, 1973), especie de utilidad potencial en la fabricación industrial de queso.

Para el uso comercial por la industria quesera es obvio que se precisa obtener información sobre la actividad coagulante y la actividad proteolítica de este cuajo vegetal, así como de los principales factores que afectan a una y otra, al objeto de desarrollar la tecnología más adecuada.

Recientemente se ha investigado en este Departamento la actividad coagulante del extracto de la flor del cardo *C. humilis* y la influencia de diversos factores tales como la concentración de enzima, la temperatura, el pH, el efecto combinado de la temperatura y del pH y la concentración de Cl<sub>2</sub> Ca (Martínez, 1979).

En el presente trabajo se aborda el estudio comparativo de la extensión y tipo de proteolisis de la alfa<sub>s</sub>- y beta-caseína ovinas, por la renina cristalina y la proteasa de la flor del cardo *C. humilis*, así como la influencia de la concentración de cloruro sódico en la hidrólisis relativa de ambas caseínas por cada una de las enzimas.

### *Material y métodos.*

*Enzimas.* Renina cristalina (E. C. No. 3.4.23.4), obtenida de Sigma, fue disuelta en agua destilada a una concentración de 80 ng/ml. El tiempo de coagulación de 1 ml de solución fue de 5 m. 58 s.

Extracto de polvo bruto de flor de cardo *Cynara humilis* (obtenido según describe Martínez, 1979) filtrado y diluido con agua destilada hasta conseguir una actividad coagulante aproximadamente igual a la de la solución de renina. El tiempo de coagulación de 1 ml del extracto diluido fue de 6 min. 18 s. La concentración de proteína de dicho extracto diluido fue de 4,3 mg/ml.

#### *Determinación de proteína.*

La proteína de las soluciones enzimáticas se determinó por el método de Jhonson (1941), utilizando como referencia albúmina de suero bovino (Sigma).

#### *Determinación del tiempo de coagulación.*

Se siguió la técnica de Berridge (1952a y b) adoptada por la *British Standards Institution* (1963 b), en la forma descrita por Martínez (1979).

#### *Preparación de la caseína entera ovina.*

Se siguió básicamente el procedimiento de precipitación isoeléctrica descrito por Akroyd (1968) para la preparación de caseína entera bovina, pero ajustando el pH a 4,3 y calentando a 60° C durante 30 min.

#### *Determinación de humedad.*

El porcentaje de humedad de la caseína se determinó por desecación en estufa de aire caliente, hasta peso constante, de acuerdo con la norma B. S. 770 (*British Standards Institution*, 1963a). La determinación se hizo por duplicado.

#### *Preparación del sustrato.*

Como sustrato proteolítico se utilizó una solución de caseinato al 3 p. 100 en tampón fosfato 0,1 M de pH final 6,2, preparada disolviendo 22 g de caseína húmeda en 78,75 ml de solución de fosfato disódico 0,1 M (pH 9,1), a la que se añadieron 171,25 ml de solución de fosfato monosódico 0,1 M, después de pasteurizar separadamente ambas soluciones fosfato a 60° C durante 30 min. La solución de caseinato en tampón fosfato fue saturada seguidamente con tolueno.

El procedimiento de preparación descrito impide la proteólisis por la acción microbiana y por la proteasa nativa de la leche (Zittle, 1965).

#### *Incubaciones enzimáticas.*

En tres series de seis tubos de ensayo se pusieron cantidades de 0,000, 0,292, 0,584; 1,169, 1,753 y 2,338 g de ClNa y a cada tubo se añadieron seguidamente 9 ml de la solución de caseinato; a los tubos de una serie se añadió 1 ml de solución de renina cristalina; a los de otra serie, 1 ml de extracto de cardo diluido; y a la tercera serie (blanco), 1 ml de agua destilada, con lo que la molalidad del ClNa en cada serie de tubos fue de 0,0, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, y 4,0. A los 30, 60 y 120 min., 4, 6 y 12 h. y 1, 2 y 4 días de incubación a 32° C, se tomaron alícuotas de 1 ml de los

SERRANO, E.: ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE LA FLOR DEL CARDO *CYNARA H. L.*

incubados y se transfirieron a tubos de ensayo con 1 ml de solución de urea 8 M para interrumpir la acción enzimática. Los tubos con las muestras se mantuvieron a  $-28^{\circ}$  C hasta el momento de ser examinados.

#### *Determinación de la actividad proteolítica.*

La extensión y tipo de proteolisis se evaluó por la técnica de electroforesis cuantitativa en gel de poliacrilamida, desarrollada por el-Shibiny y Abd-El-Salam (1976).

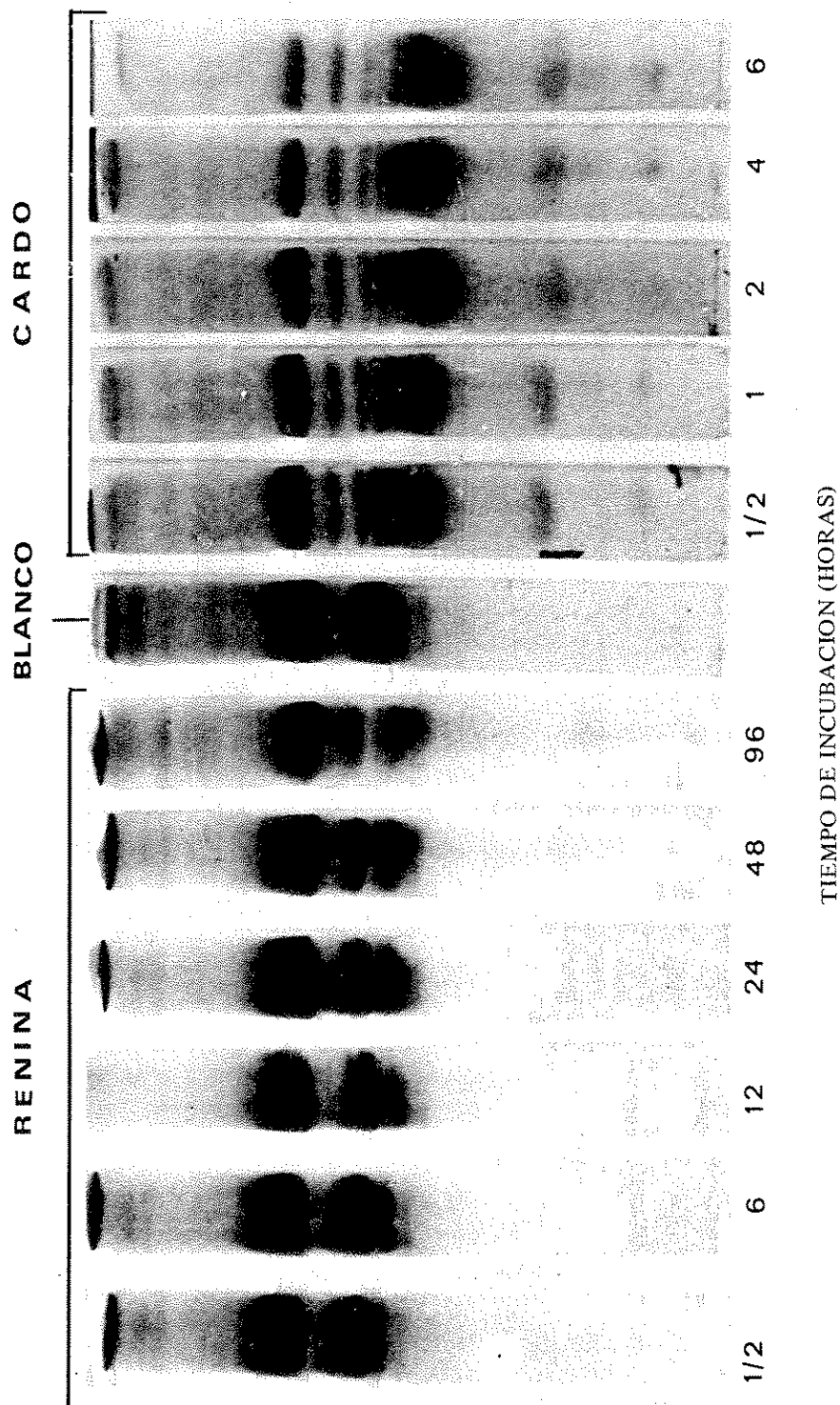
Para la separación electroforética se siguió la técnica de Ornstein y Davis (1964), descrita por Akroyd (1968).

#### *Resultados y discusión.*

Las imágenes electroforéticas en gel de poliacrilamida, a pH alcalino, de la caseína entera ovina y sus productos de degradación insolubles, a diferentes tiempos de incubación a  $32^{\circ}$  C y pH 6,2, con renina cristalina y con extracto de la flor del cardo *Cynara humilis*, se muestran en la lámina I (geles teñidos con negro amido B 10). En la figura 1 se han representado gráficamente los principales componentes electroforéticos detectados en geles teñidos, tanto en negro amido como con azul Coomasie, correspondientes a la caseína entera ovina, tanto sin incubar como incubada con cada una de las dos enzimas, algunos de tales componentes se designan a modo de ensayo.

En la caseína entera, al  $\alpha_s$ -caseína aparece, en la concentración utilizada, como banda única, si bien consta de tres componentes principales denominados de mayor a menor movilidad electroforética,  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  y  $\alpha_{s3}$ -caseína, de los cuales los dos últimos son cuantitativamente más importantes. También la beta-caseína aparece como una banda única, a pesar de estar constituida por dos componentes, denominados  $\beta_1$ - y  $\beta_2$ -caseína, de mayor a menor movilidad. En la región de la "gamma-caseína entera", de baja movilidad electroforética, son detectables cinco componentes principales.

A simple vista puede verse claramente en la lámina I que la proteasa de la flor de cardo, a pesar de tener una actividad coagulante ligeramente inferior a la de la renina, es mucho más proteolítica que la última. Vieira de Sa y Barbosa (1972) también comprobaron, basándose en la liberación de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético, que el extracto de la flor del cardo *C. cardunculus* era más proteolítico que el cuajo animal a igual actividad coagulante. La excesiva actividad proteolítica del cuajo vegetal, que puede resultar inconveniente desde el punto de vista práctico, por su efecto sobre la calidad del producto (Veringa, 1961, Maragoudakis *et al.*, 1961, Melachouris y Tuckey; 1964; Ritter, 1970; Martens y Naudts, 1973), permite, no obstante, el acortamiento del período de maduración (Vieira de Sa y Barbosa, 1972) y puede paliarse o controlarse tecnológicamente, favorecien-



LAMINA I. Electroferogramas en gel de poliacrilamida a pH alcalino de la caseína entera ovina a diferentes tiempos de incubación a 32<sup>o</sup> C (y pH 6,2) con renina cristalina y con extracto de flor de cardo *C. humilis*; ambas enzimas fueron ajustadas a la misma actividad coagulante (Tinción: negro amido B 10).

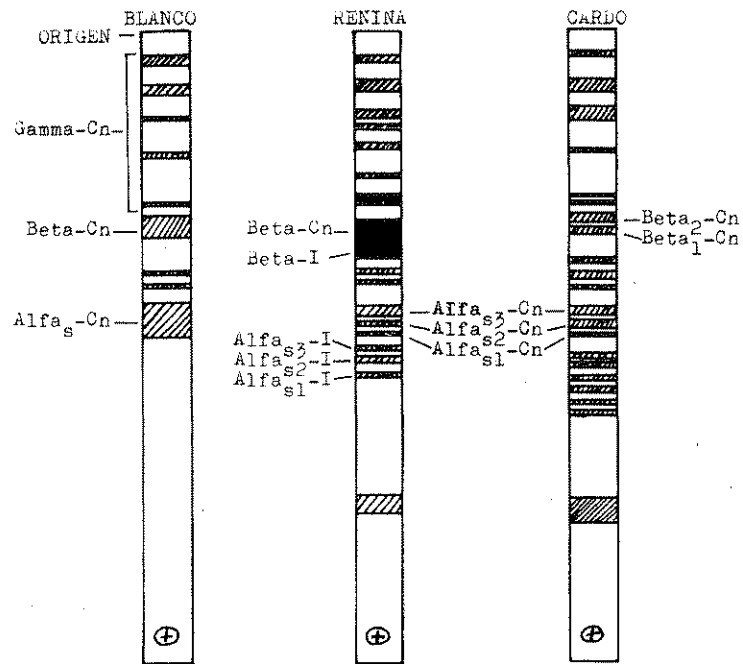


FIGURA 1. Diagrama de los componentes electroforéticos detectados en la caseína entera ovina sin incubar e incubada con renina cristalina y con extracto de flor de cardo.

do la actividad coagulante mediante la acidificación de la leche o adición de cloruro cálcico (Nielsen, 1975) y reduciendo su actividad proteolítica mediante el empleo en las salas de curado de temperaturas de refrigeración (Martens y Maudts, 1973) o regulando adecuadamente otros factores influyentes.

*Productos insolubles resultantes de la hidrólisis de la caseína ovina por la acción de la renina cristalina.*

Cuando la caseína ovina se incuba con renina aparecen tres bandas inmediatamente delante de la  $\alpha_s$ -caseína, de las cuales la central es más intensa, estas bandas se intensifican progresivamente con el tiempo de incubación (véase lámina I). Los componentes de tales bandas son productos de degradación de las  $\alpha_s$ -caseínas que hemos designado, de mayor a menor movilidad electroforética,  $\alpha_{s1}$ -I,  $\alpha_{s2}$ -I y  $\alpha_{s3}$ -I (véase fig. 1), por ser los primeros productos de degradación de las  $\alpha_s$ -caseínas ovinas por la acción de la renina. Estos productos de alta movilidad electroforética se han detectado igualmente en quesos fabricados con leche de oveja y cuajo animal (Ramos *et al.*, 1976; 1977; Ordóñez *et al.*, 1978; Marcos *et al.*, 1978a, 1979d; Mora, 1979). Su movilidad mayor que la de las correspondientes  $\alpha_s$ -caseínas indica que probablemente son de naturaleza más acídica.

También por la acción de la renina sobre la caseína entera ovina aparece y se intensifica progresivamente durante la incubación una banda situada inmediatamente delante de la beta-caseína. En los ferogramas teñidos con negro amido la citada banda casi se confunde con la beta-caseína, pero era claramente diferenciable en los geles teñidos con azul Coomassie. A esta banda la hemos designado beta-I (fig. 1) por ser el primer producto de degradación de la beta-caseína mediante la acción de la renina. Previamente, sólo se ha detectado una banda similar en ferogramas teñidos con negro amido de una partida de queso manchego en la que la proteolisis fue anormalmente intensa (Mora, 1979). Es posible que no se haya detectado en otras investigaciones por estar enmascarada por la beta-caseína.

Los componentes presentes en la región de la "gamma-caseína entera" ovina también resultan afectados por la renina y originan productos de degradación que forman nuevas bandas de distinta movilidad relativa (fig. 1).

*Productos insolubles resultantes de la hidrólisis de la caseína ovina por la proteasa de la flor de cardo.*

La caseína entera ovina es hidrolizada por la proteasa de la flor de cardo más intensamente que por la renina, y además los productos de hidrólisis son más abundantes y de diferente naturaleza (lámina I).

La hidrólisis de la  $\alpha_s$ -caseína por la proteasa vegetal da origen a seis productos de degradación, de mayor movilidad electroforética (lámina I); los seis productos de degradación insolubles sugieren la hidrólisis de cada una de las tres moléculas

de alfa<sub>s</sub>-caseína por uno u otro de dos enlaces sensibles que serían atacados con la misma facilidad por la proteasa de la flor del cardo.

Por la acción del coagulante vegetal sobre la beta-caseína ovina se forma un producto de degradación de mayor movilidad electroforética, que se sitúa entre la alfa<sub>s</sub>- y la beta-caseína (lámina I y fig. 1). Este producto difiere claramente del originado por la renina, por su mayor movilidad relativa, intermedia entre la alfa<sub>s</sub>- y beta-caseína, en lugar de situarse inmediatamente delante de la beta-caseína.

En los quesos de los Pedroches y de la Serena, fabricados con leche de oveja y cuajo vegetal, este producto de degradación de la beta-caseína no se ha detectado (Fernández-Salguero, 1975; Marcos *et al.*, 1976, 1977; Marsilla, 1978), lo que parece sugerir que en tales variedades de queso la proteólisis de la beta-caseína se debe esencialmente a la acción de la proteasa alcalina de la leche y/o de las enzimas bacterianas, cuyos productos de hidrólisis son menos móviles y se acumulan en la región electroforética de la gamma-caseína.

En los componentes situados en la región electroforética de la "gamma-caseína entera" también se observan cambios proteolíticos inducidos por el coagulante, aunque distintos de los causados por la renina (fig. 1).

La proteólisis de la caseína entera ovina por el extracto de la flor del cardo origina así mismo una banda de alta movilidad electroforética (lámina I), quizás formada por un polipéptido de naturaleza sumamente acídica; este producto de hidrólisis, de naturaleza desconocida, también se forma, aunque en menor cuantía y mucho más tardíamente, por la acción de la renina.

*Hidrólisis relativa de la alfa<sub>s</sub>- y beta-caseína ovinas por la renina cristalina y por la proteasa de la flor de cardo.*

Aunque por examen visual de los geles electroforéticos de la lámina I parece que la beta-caseína es mucho más resistente a la acción de la renina que la alfa<sub>s</sub>-caseína (probablemente a consecuencia de la escasa separación entre la beta-caseína y sus primeros productos de degradación), los resultados cuantitativos obtenidos indicaron sin embargo que ambas fracciones se hidrolizaron aproximadamente a la misma velocidad. Este resultado concuerda con las observaciones de Ledford *et al.*, (1966), Fox (1969) y Creamer (1970) de que dichas fracciones de la caseína "bovina" se degradan aproximadamente a la misma velocidad cuando el substrato se encuentra en solución relativamente diluida. No obstante, Ledford *et al.*, (1968) demostraron posteriormente que, en soluciones de caseinato sódico (bovino) incubadas a 37° C, la alfa<sub>s</sub>-caseína era hidrolizada por la renina a una velocidad varias veces superior a la de la beta caseína, aunque la última terminaba siendo totalmente degradada. Este resultado, aparentemente contradictorio, puede ser debido al efecto de la temperatura, pues la sensibilidad relativa de la alfa<sub>s1</sub> y beta-caseína a la proteólisis depende de la temperatura, siendo favorecida la proteólisis de la beta-caseína a bajas temperaturas de incubación y viceversa (Fox, 1969).



También por la acción de la proteasa de la flor del cardo la alfa<sub>s</sub> - y beta-caseína ovinas se hidrolizaron a velocidades casi iguales, aunque la proteólisis de la beta-caseína fue ligeramente más rápida.

Los datos cuantitativos indicaron claramente que, a igual actividad coagulante, la actividad proteolítica del coagulante vegetal resultó al menos diez veces superior a la de la renina. Esta gran diferencia en la actividad proteolítica de ambos coagulantes, observada electroforéticamente, es mucho mayor que la encontrada por Vieira de Sa y Barbosa (1972) para el extracto de cardo *C. cardunculus* mediante análisis químico (NNP), debido sin duda a que los primeros productos de la proteólisis son de naturaleza insoluble (en ATA al 12 p. 100) y no se detectan por métodos químicos (Lindqvist y Storgards, 1959, 1960; Cherbulis *et al.*, 1960).

*Influencia del cloruro sódico en la hidrólisis de la alfa<sub>s</sub> - y beta-caseína ovinas por la renina y por la proteasa de la flor del cardo.*

Se ha señalado que uno de los factores que influyen en la proteólisis de la renina sobre la caseína "Bovina" es la concentración salina (Stadhoulers, 1962) y que la sal determina una inhibición selectiva de la hidrólisis de la beta-caseína (Fox y Walley, 1971). Sin embargo, dicho efecto parece no reflejarse en los quesos de bola maduros (Esteban *et al.*, 1979) ni en un amplio grupo de quesos de diferentes variedades europeas fabricadas con leche de vaca y cuajo animal (Marcos *et al.*, 1979a).

En los quesos de los Pedroches y en los de la Serena, variedades fabricadas con leche de oveja y cuajo vegetal, se ha observado incluso que no existen correlaciones estadísticamente significativas entre la sal de los quesos y la hidrólisis de la beta-caseína y en cambio son muy significativas las relaciones existentes con las cantidades relativas de alfa<sub>s</sub>-caseína residual (Marcos *et al.*, 1976, 1979b y c). Dichas relaciones sugieren una influencia inversa de la sal sobre la proteólisis relativa de las caseínas ovinas en el queso, es decir que la sal inhibe selectivamente la hidrólisis de la alfa<sub>s</sub>-caseína sin afectar a la proteólisis de la beta-caseína.

En un intento de aclarar estos resultados discrepantes se ha estudiado el efecto del ClNa sobre la hidrólisis de la alfa<sub>s</sub> - y beta-caseína ovinas tanto por la acción de la renina cristalina como por la acción de la proteasa de la flor de cardo. Para ello, alícuotas de una solución de caseinato ovino (pH 6,2) con diferentes concentraciones de ClNa (de 0,0 a 4,0 M) se incubaron (a 32° C) tanto con solución de renina cristalina como con extracto de flor de cardo de igual actividad coagulante y se tomaron muestras para su examen electroforético simultáneo a diferentes periodos de incubación.

Pese al cuidado con que la experiencia se llevó a cabo, los resultados obtenidos en los diferentes periodos de incubación no indican una influencia definida y consistente de la sal en la proteólisis relativa de las caseínas, por ambas enzimas. Los ferogramas obtenidos a las 6 y 12 horas de incubación parecían indicar que a medida que aumentaba la concentración de cloruro sódico disminuía la hidrólisis por la

SERRANO, E.: ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE LA FLOR DEL CARDO *CYNARA H. L.*

renina, tanto de la alfa<sub>s</sub>-caseína como de la beta-caseína; efecto que no se observó en períodos de incubación precedentes o posteriores. Ninguna concentración de cloruro sódico inhibió totalmente la actividad proteolítica de la renina sobre la alfa<sub>s</sub>- o beta-caseína ovinas. Fox y Walley (1971) comprobaron que una concentración de ClNa del 5 p. 100 favorecía la hidrólisis de la alfa<sub>s1</sub>-caseína "bovina" por la renina y que a concentraciones de ClNa del 10 p. 100 y superiores se inhibía totalmente la proteólisis de la beta-caseína.

Tampoco mostraron consistencia los resultados relativos al coagulante vegetal, aunque parece ser que en general el cloruro sódico tiene cierto efecto inhibitorio sobre la hidrólisis de la beta-caseína. Los datos cuantitativos, referentes al efecto del ClNa sobre la hidrólisis de la alfa<sub>s</sub>- y beta-caseína ovinas, por el extracto de la flor de cardo, a la hora de incubación, indican que la sal favorece ligeramente la degradación de la alfa-caseína y reduce ligeramente la degradación de la beta-caseína, sin que ambos efectos guarden relación cuantitativa con la concentración salina.

En ningún caso se observó que la sal influyera en la naturaleza de los productos de degradación de la alfa<sub>s</sub>- y beta-caseína ovinas por la acción de la renina o de la proteasa de la flor de cardo.

#### *Agradecimiento.*

Expresamos nuestro agradecimiento al Dr. D. Eugenio Domínguez Vilchez, del Departamento de botánica de la Facultad de ciencias de la Universidad de Córdoba, por la identificación de la especie de cardo.

#### *Bibliografía.*

- Akroyd, P. 1968.—*Apud* Chromatographic and electrophoretic Techniques. t. 2, p. 399 (ed. I. Smith), William Heinemann, London.
- Anónimo, 1973.—Catálogo de quesos españoles. 2.<sup>a</sup> ed., Ministerio de Agricultura, Madrid.
- Barbosa, M., E. Valles, L. Vassal y G. Mocquot, 1976.—Lait, 54. 1.
- Berridge, N. J. 1952a.—J. Dairy Res., 19: 328.
- Berridge, N. J., 1952b.—Analyst (London), 77: 57.
- British Standards Institution 1963a.—Methods for the chemical analysis of cheese. B. S. 770.
- British Standards Institution 1963b.—British Standard 3624. 1963. London.
- Creamer, L. K. 1970.—N. Z. J. Dairy Sci. Technol., 5: 152.
- Cherbulis, J., J. H. Custer y C. A. Zittle, 1960.—J. Dairy Sci., 43: 1725.

SERRANO, E.: ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE LA FLOR DEL CARDO *CYNARA H. L.*

- El-Shibini, S. y M. H. Abd El Salam, 1976.—*Milchwissenschaft*, 31: 80.
- Esteban, M. A.; A. Marcos; J. Fernández-Salguero; y F. León, 1979.—*Arch. zootec.*, 28: 101.
- Fernández-Salguero, J. 1975.—Tesis doctoral. Univ. Córdoba (España).
- Fox, P. F., 1969.—*J. Dairy Sci.*, 52: 1214.
- Fox, P. F. y Walley, B. F. 1971.—*J. Dairy Res.*, 38: 165.
- Green, M. L. 1977.—*J. Dairy Res.*, 44: 159.
- Jhonson, M. L. 1941.—Third Int. Congr. Microbiol. New York, 1939.
- Ledford, R. A.; J. H. Chen y K. R. Nath, 1968.—*J. Dairy Sci.*, 51: 792.
- Ledford, R. A.; A. C. O'Sullivan y K. R. Nath, 1966.—*J. Dairy Sci.*, 49: 1098.
- Lindqvist, B. y T. Storgards, 1959.—*Acta Chem. Scand.*, 13: 1839.
- Lindqvist, B. y T. Storgards, 1960.—*Acta Chem. Scand.*, 14: 757.
- Maragoudakis, M. E.; J. O. Young y R. W. Stein, 1961.—*J. Dairy Sci.*, 44: 2339.
- Marcos, A.; M. A. Esteban y J. Fernández-Salguero, 1976.—*Arch. zootec.*, 25: 73.
- Marcos, A.; M. A. Esteban y J. Fernández-Salguero, 1977.—*Trab. Cient. Univ. Córdoba (España)* n.º 15.
- Marcos, A.; M. A. Esteban, F. León y J. Fernández-Salguero, 1979a.—*J. Dairy Sci.*, 62: 892.
- Marcos, A.; J. Fernández-Salguero y M. A. Esteban, 1978a.—*Arch. zootec.*, 27: 341.
- Marcos, A.; J. Fernández-Salguero y M. A. Esteban, 1979b.—*Anal. Bromatol.*, 30: 314.
- Marcos, A.; J. Fernández-Salguero; M. A. Esteban y F. León, 1979c.—*J. Dairy Sci.*, 62: 392.
- Marcos, A.; F. León; J. Fernández-Salguero y M. A. Esteban, 1979d.—*Arch. zootec.*, 28: 123.
- Marsilla, B. A. 1978.—Tesis de licenciatura. Fac. Veter. Univ. Córdoba (España).
- Martens, R. y M. Naudts, 1973.—*Ann. Bull., I. D. F.*, 24: 1.
- Martínez, E. 1979.—Tesis de licenciatura. Fec. Veter. Univ. Córdoba (España).
- Melachouris, N. P. y S. L. Tuckey, 1964.—*J. Dairy Res.*, 37: 14.
- Ordóñez, J. A.; R. Barneto y M. Ramos, 1978.—*Milchwissenschaft*, 33: 609.
- Ornstein, L. y B. J. Davis, 1964.—*Ann. Acad. Sci.*, N. Y. 121: 321- y 340.
- Ramos; M.; I. Martínez Castro y M. Juárez, 1977.—*J. Dairy Sci.*, 60: 870.