

"SCREENING" DE LAS CEPAS PROTEOLITICAS DEL QUESO TIPO  
MANCHEGO Y ACCION DE LAS PROTEASAS DE LAS SUSPENSIONES  
DE CELULAS SOBRE LA  $\alpha_s$  Y  $\beta$  CASEINA.

(SCREENING OF PROTEOLYTIC STRAINS FROM MANCHEGO TYPE CHEESE AND  
ACTION OF THE CELL SUSPENSIONS PROTEASES ON  $\alpha_s$  AND  $\beta$ -CASEIN).

por

A. MARCOS, M. ASUNCION ESTEBAN, J. ESPEJO, PILAR MARTINEZ y  
M. TERESA MUÑOZ \*

*Introducción.*

La proteólisis es un proceso esencial en la maduración de los quesos, estrechamente relacionado con la calidad organoléptica del producto.

La hidrólisis de las paracaseínas de la cuajada es de naturaleza enzimática y en ella participan las enzimas del coagulante de la leche, la proteasa alcalina natural de la leche y las proteasas microbianas de gérmenes originalmente presentes en la leche, de los cultivos lácticos añadidos y de los microorganismos que contaminan al producto durante su obtención.

En la degradación de las caseínas a productos solubles por la acción microbiana intervienen las proteasas exocelulares de los microorganismos vivos y las proteasas endocelulares liberadas por la autólisis de las células microbianas. Particularmente potentes a este respecto son las enzimas de determinados hongos y levaduras responsables de la maduración de algunas variedades de quesos, así como las de las bacterias denominadas proteolíticas, si bien diversas bacterias lácticas (fundamentalmente los estreptococos y los lactobacilos) y los micrococcos, exhiben también cierta actividad proteolítica.

La determinación de la actividad proteolítica de los microorganismos presentes en los diversos tipos de queso y de la acción específica de las proteasas microbianas sobre las diferentes paracaseínas, es de indudable interés tecnológico para la selección de los cultivos a emplea en quesería.

Baribo y Foster (1955) investigaron la relación existente entre la maduración del queso y la actividad proteolítica de *Lactobacillus casei* y *Streptococcus lactis*,

---

\* Cátedra de Tecnología y Bioquímica de los Alimentos. Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba (España).

Recibido para publicación el 24-9-1976.

Stadhouders (1959) la acción de *S. faecalis*, *L. casei* y bacterias del género *Alcaligenes* sobre el queso holandés y Sasaki y Nakae (1960) la actividad proteolítica de *L. casei*, *S. lactis* y *L. bulgaricus*.

Anibaldi (1962) comprobó que *S. faecalis-lactis* hidrolizaba la  $\beta$ -caseína, que determinadas bacterias del género *Alcaligenes* y *Bacillus subtilis* hidrolizan prioritariamente a la  $\beta$ -caseína y después a la  $\alpha$ -caseína y que *L. helveticus* degrada casi simultáneamente a ambas fracciones, aunque con ligera prioridad a la  $\alpha$ -caseína.

Desde hace tiempo se ha indicado que determinadas bacterias lácticas excretan proteasas extracelulares que hidrolizan las caseínas de la leche descremada utilizada como medio de cultivo (Grutter y Zimmerman, 1955; Sasaki y Nakae, 1959, Williamson *et al.*, 1964; Sugart y Beck, 1964; Millar y Candler, 1967).

Gordon y Speck (1965) observaron que cuando *S. cremoris* se cultiva en leche descremada, la población de células decrece notablemente a partir de las 24 horas, coincidiendo con un incremento de la acción hidrolítica. *S. cremoris*, *S. lactis*, *L. bulgaricus* y *L. helveticus* degradan esencialmente a la  $\alpha_1$ -caseína cuando se cultivan durante 7 días en leche descremada (Ohmiya y Sato, 1967, 1968). Se ha sugerido que la acción hidrolítica se debe a proteasas intracelulares liberadas por autólisis (Imamura, 1960; Poznanski *et al.* 1965; Sato y Najakima, 1965; Cowman *et al.*, 1968).

Ohmiya y Sato (1969 a, b y c, 1970) han confirmado que las bacterias lácticas anteriormente citadas comienzan a autolisarse en el queso a partir de los 6-12 días de maduración, liberando proteasas intracelulares que actúan preferentemente sobre la  $\alpha_1$ -caseína, hecho que concuerda con los resultados obtenidos por Poznanski *et al.* (1965) con una mezcla de proteasas intracelulares extraída de células de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *M. caseolyticus*. Ohmiya y Sato (1972) consideran que las proteasas endocelulares liberadas por autólisis de las bacterias lácticas contribuyen más que la renina a la hidrólisis de la caseína del queso.

Carini y Ottogalli (1967) y Carini *et al.* (1969) examinaron la actividad proteolítica de distintas cepas de estreptococos y lactobacilos que frecuentemente intervienen en la maduración del queso, comprobando que todas ellas poseían un sistema enzimático proteolítico endocelular.

Carini y Resmini (1968) han estudiado también la actividad proteolítica de extractos celulares obtenidos de diversas cepas de *S. Thermophilus* y de dos cepas de *Torulopsis sphaerica* y una de *T. candida* aislada del queso Taleggio.

Ducastelle u Lenoir (1969), evaluando la actividad de las proteasas intracelulares de diferentes estreptococos lácticos, lactobacilos (*L. plantarum*), micrococos y levaduras (*Sacharomyces* y *Candida*), aislados del queso Saint-Paulin en curso de

maduración, llegaron a la conclusión de que la degradación proteica de este tipo de queso se debe esencialmente a los estreptococos, cuya actividad estimada fue mil veces superior a la de los micrococos y levaduras y casi diez mil veces superior a la de los lactobacilos. Los citados autores observaron que una cepa de micrococos y las levaduras, en especial las del género *Saccharomyces*, excretaban proteasas extracelulares.

Libudzisz y Metodieva (1970) comprobaron que las preparaciones enzimáticas brutas de *S. lactis* y *S. diacetilactis* digerían en mayor grado la caseína entera que sus fracciones  $\alpha_s$ ,  $\beta$  y  $\kappa$  y que la actividad proteolítica frente a los diversos sustratos dependía tanto de la edad de los cultivos como de la composición del medio.

Lusiani *et al.* (1971) han investigado la caseinólisis causada por algunas cepas de bacterias acidolácticas (*S. lactis*, *S. cremoris*, *S. diacetilactis*, *S. faecalis*, *S. faecalis* var. *liquefaciens*, *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*), que ordinariamente se encuentran en los quesos de pasta azul, hallando que algunas cepas de *S. faecalis* son fuertemente proteolíticas y atacan a las proteínas de la leche del mismo modo que *Penicillium roqueforti*.

Examinando la actividad proteolítica endocelular de un elevado número de lactobacilos aislados de 12 variedades de queso, Tourneur (1972) han observado que la actividad proteolítica era muy variable de unas cepas a otras.

Actualmente se sabe que la  $\beta$ -caseína del queso es bastante refractaria a la hidrólisis por la acción de la renina y se sospecha que su degradación es causada por la proteasa natural de la leche o por las enzimas microbianas. Se piensa también que los micrococos pueden desempeñar un importante papel en tal sentido. Estos suelen alcanzar elevadas poblaciones al comienzo de la maduración, que decrecen después notablemente coincidiendo con el comienzo de la degradación de la  $\beta$ -caseína, lo que sugiere la intervención de las proteasas endocelulares de la células lisadas, Moreno y Kosikowski (1973) han estudiado la degradación de la  $\beta$ -caseína por preparaciones enzimáticas exentas de células obtenidas de *Micrococcus freudenreichii*, *M. caseolyticus* y *M. candidus* encontrando que todas hidrolizaban la  $\beta$ -caseína, siendo los primeros productos de degradación grandes péptidos en el caso de las proteasas de *M. freudenreichii* y *M. caseolyticus* y pequeños péptidos en el caso de *M. candidus*.

Más recientemente Carini *et al.* (1975) han estudiado los sistemas caseinolíticos exo y endocelulares de levaduras aisladas de diversas variedades de quesos italianos y su papel en la maduración de los mismos.

Siguiendo la evolución de la flora microbiana durante la maduración del queso manchego, Roman (1975) ha comprobado que los estreptococos constituyen la flora dominante durante todo el proceso madurativo, aunque al término de la maduración los lactobacilos llegan a adquirir la misma importancia cuantitativa. Los micrococos, las levaduras y los mohos forman poblaciones de menor importancia numérica.

Los objetivos del presente trabajo son: 1) efectuar un "screening" de los microorganismos proteolíticos presentes en el queso tipo manchego maduro empleando el medio de Martley *et al.* (1970), de gran sensibilidad para detectar bacterias débilmente proteolíticas y que proporciona información sobre la extensión de la proteólisis, 2) determinar la acción de las proteasas de las cepas aisladas sobre la  $\alpha_s$ - y  $\beta$ -caseína y 3) precisar si existe alguna relación entre el tipo de halo formado en el medio de Martley *et al.* (1970) por las cepas aisladas y su actividad proteolítica.

### *Material y métodos.*

*Muestras de queso:* El "screening" de cepas proteolíticas se efectuó sobre 21 muestras de queso tipo manchego de distinto origen, adquiridas en el mercado. Las muestras fueron tomadas mediante dos cortes radiales de cuchillo, confluentes en el centro del queso, para obtener un sector de unos 200 g de queso. Las muestras fueron individualmente envueltas con hoja de aluminio y envasadas en bolsas de polietileno, que se cerraron herméticamente y transportaron al laboratorio en menos de 48 horas.

*Preparación de las muestras analíticas.* Se procedió de acuerdo con la norma 34 105 hl de la UNE (1969), De cada muestra de queso se obtuvo con cuchillo una cuña central de alrededor de 100 g de queso, que después de descortezada se picó finamente y luego trituró y homogeneizó con mortero. El material homogeneizado se transfirió a frascos de boca ancha y cierre hermético que se mantuvieron en refrigeración ( $2 \pm 2^\circ$  C) hasta el momento del análisis.

La preparación de las muestras analíticas se hizo con material esterilizado, operando en condiciones asépticas.

*Preparación de diluciones.* Veinte gramos de cada muestra analítica fueron homogeneizados con 100 ml de agua destilada estéril a 5.000 rpm/2 min con homogeneizador Sorval Omni-Mixer, cuyo vaso y cuchillas habían sido previamente esterilizados.

A partir del homogeneizado se prepararon diluciones decimales sucesivas, transfiriendo un mililitro de la dilución inmediatamente precedente a un tubo con tapón de rosca conteniendo 9 ml de solución de Ringer diluida 1/4, previamente esterilizado en autoclave.

*Aislamiento de las cepas proteolíticas.* De cada dilución se sembró un mililitro en dos placas de Petri conteniendo *Standard Methods Caseinate Agar* (SMCA) preparado como describen Martley *et al.* (1970), agitando las placas sembradas para cubrir toda la superficie de líquido. El líquido sobrante se hizo confluír seguidamente hacia un punto invirtiendo la placa y manteniéndola inclinada y se extrajo con jeringa introduciendo la aguja entre las paredes del cuerpo y de la tapa.

Las placas sembradas se incubaron seguidamente a 30°C durante 48 horas. Las colonias proteolíticas dominantes en cada muestra de queso y todas las que mostraban diferentes tipos de halo de proteólisis, fueron aisladas con aguja de platino y sembradas por picadura profunda en medio SMA, previamente repartido en alícuotas de 5 ml en tubos con cápsula de aluminio y esterilizado en autoclave. Después de incubar los tubos sembrados a 30°C durante 48 horas, las cepas aisladas se conservaron en refrigeración a  $2 \pm 2^\circ\text{C}$ .

*Medida del halo de proteólisis.* Las cepas proteolíticas de la colección se sembraron individualmente con aguja de platino en diversos puntos de placas de Petri con SMCA, que se incubaron seguidamente a 30°C y fotografiaron a las 24 y 48 horas de incubación juntamente con una escala métrica.

Sobre las fotografías se midió con compás el diámetro de las colonias, de los halos internos transparentes de los halos externos blanquecinos, tanto a las 24 como a las 48 horas de incubación.

*Determinación de la actividad proteolítica.* Como sustrato proteico se empleó una solución acuosa de caseinato sódico (*New Zeland Dairy Board*, Wellington, Nueva Zelanda) conteniendo 2,5 g de Proteína/100 ml. La solución se repartió en alícuotas de 5 ml en tubos de cultivo con cápsula de aluminio y se pasteurizó a 67°C/30 min. El pH final fue de 6,8.

Para inocular el sustrato las cepas proteolíticas de la colección obtenida se sembraron aisladamente en estrias con asa de platino sobre SMA, previamente repartido en alícuotas de 4 ml en tubos de cultivo provistos de cápsulas de aluminio, esterilizado a 121°C/15 min. y dejado solidificar manteniendo los tubos inclinados.

Después de incubar los tubos sembrados a 30°C/24 h, la biomasa desarrollada fue parcialmente arrastrada —para formar una suspensión de células no lavadas— vertiendo en cada tubo el contenido de un tubo de sustrato proteico, agitando suavemente y transfiriendo la suspensión al tubo de sustrato proteico. Las suspensiones de células no lavadas se incubaron seguidamente a 30°C/24 h.

Terminado el período de incubación, a una alícuota de la suspensión se añadió un volumen igual de urea 7 M recién preparada y se procedió al examen electroforético en gel de acrilamida siguiendo la modificación de Akroyd (Smith, 1968) de la técnica de Ornstein y Davis (1964), descrita en una publicación anterior (Marcos *et al.*, 1976). Los geles teñidos se leyeron densitométricamente para calcular el porcentaje de  $\alpha_s$ - y  $\beta$ -caseína hidrolizadas.

### *Resultados y discusión*

Sobre 21 muestras de queso tipo manchego adquiridas en el comercio procurando que su origen fuera lo más variado posible, se ha efectuado un "screening"

de organismos proteolíticos utilizando el medio sólido de Martley *et al.* (1970). En este medio (SMCA) los organismos proteolíticos se evidencian porque durante el desarrollo activo de las colonias las proteasas difunden en el agar y actúan sobre el caseinato degradándolo esencialmente a para  $\beta$ -k-caseína y pequeñas cantidades de productos de degradación de la  $\alpha_s$ - y  $\beta$ -caseína de alto peso molecular, que forman un halo de precipitado blanquecino en torno a la colonia, tanto mayor cuanto mayor sea el área de difusión de las proteasas. Si las proteasas son muy activas los productos que forman el precipitado blanco van siendo ulteriormente degradados a productos solubles, lo que da origen a la aparición de una zona interna clara en torno a la colonia. En este medio tanto el tamaño como el tipo de halo (áreas relativas del anillo blanquecino externo y de la zona transparente interna) proporcionan un índice de la extensión de la proteólisis (Martley *et al.* (1970). Puesto que las colonias proteolíticas se evidencian sin necesidad de añadir un precipitante de proteínas, las cepas proteolíticas pueden aislarse para ulteriores investigaciones.

Como resultado del "screening" se obtuvo una colección de 58 cepas de organismos proteolíticos que se utilizó para investigar el tipo de halo de proteólisis formado en el medio de Martley *et al.* (1970) por las diferentes cepas aisladas y la acción hidrolítica de las suspensiones de células no lavadas sobre la  $\alpha_s$ - y  $\beta$ -caseína.

Para estudiar la acción hidrolítica sobre las dos principales fracciones caseínicas se prepararon suspensiones de células jóvenes (24 horas) utilizando como sustrato proteico y medio dispersante una solución de caseinato, que se incubaron durante 24 horas a 30 °C. Terminada la incubación las caseínas se analizaron electroforéticamente, calculándose por densitometría los porcentajes de  $\alpha_s$ - y  $\beta$ -caseína hidrolizadas por las diferentes suspensiones. En el cuadro I se expone el porcentaje de  $\alpha_s$ - y  $\beta$ -caseína degradada por las suspensiones de células de 39 de las cepas aisladas. Las restantes cepas aisladas, casi un tercio del total, hidrolizan completamente al menos una de las principales caseínas.

Para evaluar la actividad relativa de las proteasas sobre la  $\alpha_s$ - y  $\beta$ -caseína de las 19 cepas altamente proteolíticas (que hidrolizaron totalmente al menos una de las caseínas citadas en 24 horas) se hicieron nuevas pruebas reduciendo el período de incubación a 6 horas. Incluso en estas condiciones 5 de las suspensiones de células hidrolizaron totalmente a ambas caseínas (cuadro II).

Como indican los resultados expuestos en los cuadros I y II la acción hidrolítica sobre las caseínas de las cepas aisladas es muy variable. En casi la mitad (43 p. 100) de las cepas aisladas del queso se observa cierta inespecificidad de ataque sobre la  $\alpha_s$ - y  $\beta$ -caseína (la diferencia en el porcentaje de hidrólisis de una y otra fracción es inferior a 10 unidades), más de la tercera parte del total de las cepas (el 36 p. 100) actúan preferentemente sobre la  $\beta$ -caseína, si bien no se han observado grandes diferencias en la velocidad de la hidrólisis de ambas caseínas (la máxima diferencia ob-

CUADRO I. Porcentajes de  $\alpha_s$ - y  $\beta$ -caseína hidrolizadas por las suspensiones de células no lavadas a las 24 horas de incubación a 30° C.

Cepa núm.	$\alpha_s$	$\beta$		Cepa núm.	$\alpha_s$	$\beta$
1	62	56		21	0	46
2	61	47		22	39	31
3	68	58		23	32	47
4	3	0		24	45	49
5	19	7		25	62	64
6	55	8		26	38	20
7	41	19		27	42	32
8	0	20		28	16	23
9	0	20		29	60	49
10	28	84		30	49	47
11	5	0		31	48	79
12	0	8		32	27	24
13	75	84		33	25	18
14	72	77		34	26	37
15	42	36		35	32	36
16	43	54		36	44	34
17	24	45		37	39	34
18	39	62		38	14	20
19	57	74		39	44	44
20	0	56				

CUADRO II. Porcentajes de  $\alpha_s$ - y  $\beta$ -caseína hidrolizadas por las suspensiones de células no lavadas a las 6 horas de incubación a 30 °C.

Cepa núm.	$\alpha_s$	$\beta$		Cepa núm.	$\alpha_s$	$\beta$
40	10	18		50	39	45
41	19	25		51	51	10
42	25	35		52	25	32
43	24	57		53	8	15
44	15	7		54	100	100
45	56	35		55	100	100
46	24	57		56	100	100
47	10	25		57	100	100
48	24	60		58	100	100
49	63	75				

servada corresponde a la cepa número 10 del cuadro I que degrada a la  $\beta$ -caseína a una velocidad tres veces mayor que a la  $\alpha_s$ -caseína). Algunas cepas (20 y 21) no degradaron en absoluto a la  $\alpha_s$ -caseína a pesar de hidrolizar alrededor del 50 p. 100 de la  $\beta$ -caseína. Finalmente, alrededor de la quinta parte de las cepas ensayadas (el 21 p. 100) poseen proteasas que hidrolizan más rápidamente a la  $\alpha_s$ -caseína que a la  $\beta$ -caseína, variando la velocidad de ataque en algunos casos (cepas 6 y 51) en un factor de 5.7.

También se observa una alta variabilidad en lo que respecta a la acción hidrolítica de las cepas aisladas de las diferentes muestras de queso sobre las dos principales caseínas, hasta el extremo de que mientras en algunas muestras de queso todas las cepas aisladas atacaron preferentemente a la  $\alpha_s$ -caseína en otras hidrolizaron más a la  $\beta$ -caseína.

La hidrólisis de las caseínas por las suspensiones celulares parece ser debida esencialmente a la acción de proteasas exocelulares a juzgar por la técnica de "screening" utilizada —en la que los halos de proteólisis se forman, como se ha indicado, por difusión de las proteasas durante el crecimiento activo de los microorganismos— por la escasa edad (24 horas) de los cultivos empleados para inocular el sustrato y por los cortos períodos de incubación utilizados (24 y 6 horas).

Entre las características de los halos de las cepas aisladas y la acción hidrolítica de las mismas sobre las caseínas, no se ha encontrado correlación estadísticamente significativa.

#### *Resumen.*

De 21 muestras de queso tipo manchego, adquiridas en el mercado, se han aislado 58 cepas de microorganismos proteolíticos mediante un "screening" en el medio SMCA.

Las suspensiones de células en solución de caseinato, de las diferentes cepas aisladas, mostraron gran variabilidad en su acción hidrolítica sobre la  $\alpha_s$ - y  $\beta$ -caseína. El 43 p. 100 de las cepas aisladas mostraron cierta inespecificidad de ataque sobre ambas fracciones, el 36 p. 100 hidrolizaron en mayor cuantía a la  $\beta$ -caseína y el resto (21 p. 100) degradaron preferentemente a la  $\alpha_s$ -caseína.

Parece probable que, en las condiciones experimentales de este estudio, la acción hidrolítica de las suspensiones de células pueda ser debida esencialmente a proteasas exocelulares.

Entre las características de los halos de proteólisis en el medio SMCA y la acción hidrolítica de las cepas aisladas sobre las caseínas, no se ha encontrado correlación estadísticamente significativa.

### *Agradecimientos*

Las lecturas densitométricas han sido realizadas en el Instituto de Productos Lácteos de Arganda del Rey (Madrid). Agradecemos las facilidades que nos han dado su Director, Prof. D. Domingo Martín, y la ayuda de la Dra. Ramos.

### *Summary*

A collection of 58 proteolytic strains from 21 samples of commercial manchego type cheese has been constituted by screening technique on SMCA medium.

The cell suspensions in caseinate solution, of the different isolated strains, showed a high variability in their proteolytic activities on  $\alpha_s$ - and  $\beta$ -casein. Of the total strains, 43 p. 100 attacked both fractions at the same rate, 36 p. 100 attacked chiefly  $\beta$ -casein and the remainder (21 p. 100) hydrolyzed faster  $\alpha_s$ -casein.

It seems likely that, in the experimental conditions of this study, the proteolytic activity of the cell suspensions can be due mainly to extracellular proteases.

No significant difference was found between the size and type of precipitation zone forming round the colony, on the SMCA medium, and the hydrolysis of caseins by the isolated cell suspensions.

### *Bibliografía*

- Anibaldi, 1962.—XVI Int Dairy Congr., IV: 1, 545.  
Baribo, L. E. y Foster, E. M. 1955.—Lait, 1, 2, 94.  
Carini, Sandra, Cabrini, A., Todesco, Rossanna, Vezzoni, A. y Sarachi, S. 1975.—Lait, 3, 1.  
Carini, Sandra y Ottogalli, G. 1967.—Ann. Microbiol., 17, 65.  
Carini, Sandra y Resmini, P. 1968.—Ann. Microbiol., 18, 57.  
Carini, Sandra, Resmini, P. y Bozzolati, M. 1969.—Sci. Tec. Latt.-Cas, 20, 289.  
Cowman, R. A., Yoshimura, S. y Swaisgood, H. E. 1968.—J. Bacteriol., 95, 181.  
Ducastelle, A. y Lenoir, J. 1969.—Lait, 49, 615.  
Gordon, D. F. Jr. y Speck, M. L. 1965.—J. Dairy Sci., 48, 499.  
Grutter, F. H. y Zimmerman, L. N. 1955.—J. Bacteriol., 69, 728.  
Imamura, T. 1960.—Nippon Nogeikagaku Kaishi, 34, 375.  
Libudzisz, Zdzisława y Metodieva, Diana 1970.—Roczniki Technol., 19, 133.  
Lusiani, G., Bianchi-Salvadori, Bruna y Salvadori, P. 1971.—Lait, 51, 431.  
Marcos, A., Esteban, M.<sup>a</sup> Asunción y Fernández-Salguero, J. 1976.—Arch. zootec. 25, 73.  
Martley, F. G., Jayashankar, S. R. y Lawrence, R. C. 1970.—J. appl. Bact., 33, 363.

- Millar, I. y Kandler, O. 1967.—*Milchwissenschaft*, 22, 150.
- Moreno, V. y Kosikowski, F. V. 1973.—*J. Dairy Sci.*, 56, 33.
- Ohmiya, K. y Sato, Y. 1967.—*Agr. Biol. Chem.*, 31, 1318.
- 1968.—*Agr. Biol. Chem.*, 32, 291.
- 1969a).—*Agr. Biol. Chem.*, 33, 662.
- 1969b).—*Agr. Biol. Chem.*, 33, 669.
- 1969c).—*Agr. Biol. Chem.*, 33, 1628.
- 1970.—*Agr. Biol. Chem.*, 33, 1463.
- 1972.—*Milchwissenschaft*, 27, 417.
- Ornstein, L. y Davis, B. J. 1964.—*Ann. Acad. Sci., N. Y.*, 121, 321 y 404.
- Poznanski, S., Lenoir, J. y Mocquot, G. 1965.—*Lait*, 45, 3.
- Roman, María, 1975.—*Lait*, 55, 401.
- Sasaki, R. y Nakae, T. 1959.—*Jap. J. Zootech. Sci.*, 30, 7.
- Sasaki, R. y Nakae, T. 1960.—*Dairy Sci. Abst.*, 7, 356.
- Sato, Y. Nakajima, I. 1965.—*Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 39, 299.
- Smith, J. 1968.—*Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, (ed.) II, 399, Heinemann.
- Stadhouders, J. 1959.—*XV Int. Dairy Congr.*, 2, 703.
- Sugart, L. R. y Beck, R. W. 1964.—*J. Bacteriol.*, 88, 586.
- Tourneur, Colette 1972.—*Lait*, 52, 149.
- UNE 1969.—*Métodos de ensayo de queso: Obtención de muestras*, 34 105 hl.
- Williamson, W. T., Tove, S. B. y Speck, M. L. 1964.—*J. Bacteriol.*, 87, 49.