Étude des additifs chimiques dans les présures liquides, leur influence dans le pouvoir coagulant et dans la présence d'une flore microbienne préjudiciable en fromagerie

par

Carlos A. ZALAZAR et Jorge REINHEIMER*

I. INTRODUCTION

Les objectifs de ce travail ont été déterminés dans un plan de recherches dont le but est celui de déterminer l'élaboration de présures liquides pour la fromagerie, toujours en partant des animaux adultes.

Sachant que les présures liquides doivent être entièrement aptes du point de vue microbiologique, nous avons voulu étudier l'action de conservateurs chimiques qui confèrent aux présures les caractéristiques voulues.

On sait bien que la matière première pour l'élaboration de la présure possède une charge microbienne initiale très élevée. Celle-ci comprend une grande variété de micro-organismes. A ce sujet, nous intéressent très spécialement les micro-organismes qui sont particulièrement préjudiciables à la fromagerie.

On peut ranger dans ce groupe les bactéries coliformes et les bactéries sporulées, spécialement anaérobies. Il est fondamental de garantir dans les produits commerciaux l'absence de ces micro-organismes. On sait que ceux-ci sont les responsables des phénomènes qui vont produire des inconvénients dans l'élaboration des fromages. Si on fait une légère description des altérations produites par ces charges microbiennes en particulier nous devons dire d'abord que

* Facultad de Ingeniera Química, Universidad Nacional del Litoral Santa Fe (Argentina).

les bactéries du groupe coliforme sont les responsables des phénomènes gazeux, connus comme « mille yeux », lesquels peuvent apparaître déjà dans la phase du pressage. Un produit qui présente cette altération aura un aspect impropre du tranchage et il aura aussi, si la contamination est élevée, une saveur particulièrement amère.

Quant aux micro-organismes du genre *Clostridium*, leur action apparaît, en règle générale, dans les dernières phases de l'élaboration, c'est-à-dire pendant la maturation et plus particulièrement dans les fromages durs. Ces micro-organismes produisent aussi des phénomènes gazeux, et en certaines occasions ils peuvent provoquer le boursoufflage du produit. Parallèlement, apparaît une protéolyse profonde avec libération de composés volatils, caractéristiques des processus de putréfaction. Ceci, naturellement, influe sur le fromage en lui donnant une saveur et une odeur désagréables. Dans ce travail, il s'agit donc de l'étude de l'emploi de conservateurs chimiques qu'il est possible d'employer dans les présures liquides. Ces conservateurs ont pour but d'éliminer la présence de bactéries coliformes, sans modifier le pouvoir coagulant.

Une fois qu'on a obtenu, en premier ressort, l'inhibition du développement de ces micro-organismes, nous verrons à quel point les *Clostridium* et *Bacillus* ont été réduits. Si cela ne nous donne pas de résultats satisfaisants, ce sera le point de départ d'une recherche future.

II. MATERIAUX ET METHODES

Choix des conservateurs chimiques

Pour sélectionner les conservateurs chimiques avec lesquels on va faire les expériences et les contrôles, il a été tenu compte de deux facteurs :

- a) Type de micro-organisme sur lequel l'additif va être efficace.
- b) Conséquence d'une telle addition du point de vue bromatologique.

Pour de telles raisons nous avons sélectionné pour notre expérimentation : $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{COONa}$, $\text{PO}_4\text{Na}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, la variation du pH de la solution extractive, et les classiques $\text{B}(\text{OH})_3$, et ClNa , ce dernier avec des concentrations plus élevées que normalement. Si l'un quelconque de ces additifs, spécialement l'acide borique, apparaît contre-indiqué selon le Code bromatologique de la province de Santa Fé [1], par exemple, il faut remarquer que dans tous les cas, les concentrations employées, indiquées ci-après, sont tout à fait négligeables dans le produit final à cause du grand facteur de dilution qui apparaît quand on emploie la présure liquide dans les cuves fromagères et du fait que l'on sépare de celles-ci, seulement le caillé.

Choix des concentrations

On a essayé d'établir les effets isolés ou réunis des conservateurs, et ceux des concentrations et des combinaisons ont été les suivants :

— *Acide borique* : selon les recommandations les plus classiques [11], l'acide borique a été employé comme conservateur des présures liquides. On a essayé de connaître la réduction que produisait, dans les bactéries coliformes, l'addition, à la solution extractive de 3 et 5 p. 100 d'acide borique. On a diminué aussi le pH initial de la solution extractive avec ClH par rapport à ce qui est normal, et dans d'autres expériences on a élevé à la fin de la macération, la concentration de ClNa, pour détecter l'apparition de quelque résultat utile.

— *Ethanol* : la présence de couvertures lipidiques reconnues autour des cellules de bactéries Gram(—), nous a permis de penser que l'addition d'éthanol pouvait altérer la stabilité structurale cellulaire des micro-organismes coliformes [9]. L'effet isolé de l'alcool éthylique a été étudié en l'employant à une concentration de 10 p. 100 (v/v). Certains règlements bromatologiques seulement acceptent l'addition de l'éthanol aux présures liquides [1].

— *Acide borique et éthanol* : on a pensé que si l'éthanol produit dans les cellules quelques types d'altération qui permet l'accès des substances aux micro-organismes, on pouvait élever cet effet antimicrobien avec l'acide borique. D'après cette idée, on a fait trois séries de recherches :

1) Avec une concentration initiale d'alcool à 10 p. 100 (v/v) c'est-à-dire 10 ml d'éthanol/100 ml solution extractive, et 3, 4 et 5 p. 100 (p/v) d'acide borique.

2) Idem pour une concentration initiale de 12 p. 100 (v/v) d'éthanol.

3) Idem pour une concentration initiale de 15 p. 100 (v/v) d'éthanol.

— $\text{PO}_4\text{Na}_3.12\text{H}_2\text{O}$: quelques recommandations [2] nous indiquent que le $\text{PO}_4\text{Na}_3.12\text{H}_2\text{O}$ est un des orthophosphates les plus actifs sur quelques micro-organismes. On a essayé son application dans des concentrations de 5 p. 100, isolé et avec l'adjonction de 10 p. 100 (v/v) initiale d'éthanol, comme on nous l'a suggéré.

— $\text{C}_6\text{H}_5\text{COONa}$: certaines sources [2] nous ont signalé le benzoate comme un des meilleurs antibactériens et, comme tel, employé dans les présures liquides en d'autres pays. On a essayé de trouver une concentration qui nous donne de bons résultats dans l'inhibition des coliformes. De cette façon on a éprouvé des concentrations entre 0,6 et 3 p. 100 (p/v) avec des pH différents : naturel (autour du 6), 5 et 4, les deux derniers étant ajustés avec ClH. La valeur du pH_4 est comprise dans le plus haut rang du pouvoir inhibiteur du benzoate [2].

— C_6H_5COONa et éthanol : selon ce que l'on a exposé précédemment, on a pensé que l'on pouvait réduire la concentration de benzoate qui empêche le développement des coliformes, si on l'employait en même temps avec l'éthanol. Ainsi, on a essayé des concentrations de benzoate de sodium entre 0,5 et 3 p. 100 (p/v) et on a varié les quantités d'éthanol ajoutées, celles-ci étant de 3,5 et 10 p. 100 (v/v).

Les conservateurs essayés dans ce travail étaient de qualité commerciale pour s'approcher le plus possible des conditions opératoires industrielles.

— *Caillettes* : on a utilisé des caillettes d'animaux adultes, sans faire aucune sélection particulière. Lavées à l'eau, dépourvues du caractéristique tissu blanc externe, coupées en morceaux quelconques, et puis mélangées pour obtenir une certaine homogénéité, elles ont été utilisées immédiatement, sauf exceptions et dans ces cas, conservées dans le congélateur.

— *Solution extractive* : la solution extractive a été préparée dans tous les cas avec de l'eau et une concentration initiale de 10 p. 100 (p/v) de $ClNa$, avec le conservateur essayé dans la concentration étudiée pour chaque cas en particulier.

Pour chaque ensemble d'expériences, on a toujours utilisé une solution extractive témoin qui contenait seulement 10 p. 100 (p/v) de $ClNa$.

— *Technique d'extraction enzymatique* : on a travaillé pour toutes les expériences à l'échelle du laboratoire et dans des conditions uniformes, exactement de cette façon : dans des erlenmeyers de 500 ml on a mis 250 ml de solution extractive additionnée ou non de conservateur (solution témoin). On ajoutait à la préparation antérieure 125 g de caillettes coupées et mélangées comme dit ci-dessus, dans la relation en poids « solution extractive-caillettes » de 2/1. Ensuite, on mesurait le pH dans l'erlenmeyer, avec un pH-mètre, pour l'ajuster à la valeur exigée si l'on prétendait montrer l'influence du changement de pH initial dans la solution.

Les récipients fermés ont été introduits dans un bain thermostatique réglé à $25^\circ C \pm 1^\circ C$, pendant 48 h, et agités de temps en temps. Dans le but d'obtenir des résultats dans des conditions très rigoureuses, les morceaux de caillettes ont été séparés par filtration, de chaque récipient. Puis on a mis des caillettes fraîches dans chaque récipient, et on les a traitées tel qu'on l'a indiqué, en conservant la proportion 2/1. Dans cette deuxième étape des extractions, le temps et la température ont été les mêmes que dans la première étape.

Après avoir conclu la phase de l'extraction, la deuxième charge de caillettes filtrées a été séparée comme exposé précédemment et, de cette façon, on a obtenu une solution enzymatique prête pour l'étape de l'activation.

Activation de l'enzyme

On a ajusté le pH avec ClH à la valeur de 4,5 pour chacun des erlenmeyers et ceux-ci ont été maintenus à température ambiante pendant 24 h. Selon les travaux antérieurs [12] de cette équipe de chercheurs, ce procédé est le plus approprié pour obtenir l'activation de la pro-présure.

Après avoir franchi cette étape, le pH a été ajusté définitivement à 5,4, avec une solution de NaOH, valeur considérée comme la plus apte pour la stabilité de l'enzyme. Ensuite, les récipients, fermés, ont été placés dans le réfrigérateur à une température de $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, et ils ont été maintenus à cette température jusqu'au moment de leur utilisation. On ne doit pas oublier que les récipients ont été utilisés dans les 24 h suivant le dernier contrôle de pH. On n'a réalisé dans ce type d'essais aucune sorte de clarification des extraits obtenus puisque cela n'était pas le but.

Détermination de l'extrait enzymatique

Les déterminations des titres des extraits enzymatiques obtenus dans toutes les expériences, de chaque série d'essais, ont été effectuées selon la méthode adoptée par ce laboratoire [4].

Détermination des bactéries coliformes

On a obtenu dans chaque cas le NPP (nombre le plus probable) des bactéries coliformes par la méthode de Wilson [6, 10].

Le procédé, pour y parvenir, a été le suivant : on a fait des dilutions, en 90 ml d'eau, de peptone à 0,1 p. 100, contenues dans un erlenmeyer de 250 ml si bien que de chaque échantillon essayé on a obtenu une série de dilutions décimales pour assurer, au moins, que chacune d'elles puisse donner un tube de bouillon de lactose avec un résultat positif ou négatif afin de pouvoir extraire du tableau le NPP. Ce NPP a été affecté par le facteur de dilution qui correspond. Finalement, pour chaque extrait enzymatique, on a pris la teneur en bactéries coliformes comme le NPP/ml de l'extrait.

Les échantillons qui ont donné un résultat négatif au test des bactéries coliformes avec le bouillon de lactose Mc Conkey ont été essayés une autre fois mais en employant, d'une façon similaire, le bouillon « Brila » (Bouillon vert brillant-bile-lactose). Cette méthode a été conseillée en différentes publications [5, 6, 10].

Détermination du nombre de bactéries sporulées anaérobies

avec agar renforcé pour *clostridium* [3].

Détermination du nombre de bactéries sporulées aérobies

avec agar-lait-amidon [3].

III. RESULTATS

Les résultats obtenus dans ce travail ont été groupés et ordonnés dans des tableaux. Chaque tableau correspond à un conservateur ou à des combinaisons des conservateurs chimiques employés. Dans ces tableaux, on a enregistré pour tous les cas :

1. La concentration du conservateur ou des conservateurs.
2. Le pH noté au commencement de l'extraction.
3. L'activité ou pouvoir coagulant.
4. Le nombre des coliformes par chaque ml d'extrait enzymatique et divers autres renseignements nécessaires.

Les résultats négatifs pour les bactéries coliformes survivantes indiquent qu'on n'a décelé ces micro-organismes par aucun des procédés employés cités précédemment.

TABLEAU 1. — Effet du BO_3H_3

p. 100 BO_3H_3 (p/v)	pH initial	p. 100 ClNa ajouté à la fin des extractions	Activité	Nombre de coliformes/ml
3	5,05	—	4 900	$4,6 \times 10^5$
5	4,8	—	4 000	10^5
3	4,5	—	5 000	$1,5 \times 10^4$
	(ajusté avec ClH)			
3	5,1	10	3 000	$4,6 \times 10^4$

IV. DISCUSSION

Charges microbiennes des caillettes employées

Le lavage avec de l'eau courante et l'élimination du tissu musculaire blanc des caillettes expulsent seulement une partie du contenu microbien normal. La flore qui subsiste encore va augmenter remarquablement dans les deux phases de l'extraction qu'on va réaliser à 25° C, pendant une période de 96 h, si on n'additionne la solution extractive d'aucun conservateur chimique, ou simplement décroître, si la concentration de l'agent d'inhibition est déficiente ou si la nature

TABLEAU 2

Effet de l'éthanol et de la combinaison « éthanol - BO_3H_3 »

p. 100 éthanol (v/v)	p. 100 BO_3H_3 (p/v)	pH initial	Activité	Nombre coliformes/ml
10	—	6,0	5 000	$4,6 \times 10^4$
10	3	5,0	4 800	15
10	3	5,1	4 650	150
10	4	5,2	4 600	15
10	5	4,7	4 650	46
12	3	5,2	4 200	460
12	4	5,0	3 400	22
12	5	4,7	3 800	8
15	3	5,2	3 600	10^3
15	4	5	3 500	150
15	5	5	4 400	15

TABLEAU 3

Effet du $\text{PO}_4\text{Na}_3 - 12 \text{H}_2\text{O}$ avec et sans addition d'éthanol

p. 100 $\text{PO}_4\text{Na}_3 - 12 \text{H}_2\text{O}$ (p/v)	p. 100 éthanol (v/v)	pH initial	Activité	Nombre de coliformes/ml
— (témoin)	—	6	4 000	10^6
5	—	6	2 700	$1,5 \times 10^5$
5	10	6	2 900	$1,5 \times 10^5$

de celui-ci est inadéquate. On a constaté tout cela en faisant le comptage des coliformes dans les expériences témoins qui avaient été réalisées dans l'addition d'aucun conservateur chimique. Dans les quatre lots d'essais qui comprenaient toutes les extractions réalisées, le NPP de coliformes a été dans tous les cas de l'ordre de 10^6 — 10^7 , et, seulement dans un cas, de 10^8 coliformes/ml. Cela représentait un véritable état de putréfaction qu'on a observé dans tous les témoins. Cet état de décomposition était caractérisé par une couleur et une odeur très désagréables, mais, malgré cela, l'activité enzymatique était normale.

TABLEAU 4. — Effet du benzoate de sodium

p. 100 benzoate (p/v)	pH initial	Activité	Nombre de coliformes/ml
— (témoin)	5,8	4 300	10 ⁸
2	6,05	2 700	1
2,5	6,3	2 400	—
3	6,3	1 700	—
1,5	5 (ajusté avec ClH)	3 700	46
2	5 (ajusté avec ClH)	4 000	2,2
2,5	5 (ajusté avec ClH)	3 400	—
0,6	4 (ajusté avec ClH)	3 500	4,6 × 10 ⁴
1	4 (ajusté avec ClH)	3 500	10 ³
1,5	4 (ajusté avec ClH)	4 100	2
2	4 (ajusté avec ClH)	3 430	—
2,5	4 (ajusté avec ClH)	2 600	—
3	4 (ajusté avec ClH)	2 650	—

Effet des conservateurs chimiques sur la teneur en coliformes et sur l'activité enzymatique des extraits

Effet de l'acide borique : l'addition de l'acide borique dans les concentrations recommandées traditionnellement entre 3 et 5 p. 100 nous a montré, comme exposé dans le tableau 1, que la réduction du nombre des coliformes par rapport au témoin était faible, et que les essais sur les coliformes survivants indiquaient une concentration de ces micro-organismes de l'ordre de 10⁵ germes/ml. On n'a pas relevé de concentration plus élevée avec 5 g de B(OH)₃ pour 100 ml de solution extractive, car cette concentration avait produit déjà par rapport à celle de 3 g/100 ml, une diminution de l'activité enzymatique de l'ordre de 20 p. 100.

L'ajustage du pH initial à 4,5 avec ClH n'a pas donné une inhibition microbienne supplémentaire considérable.

Certains auteurs [11] citent comme efficient le doublement de la concentration de ClNa à la fin de l'extraction, mais nous avons enregistré seulement, par rapport à l'absence d'addition, une diminution pas très encourageante dans la concentration des germes.

Dans cette expérience, nous avons remarqué, cependant, que doubler la concentration du sel à la fin de l'extraction produit une diminution de l'activité coagulante dans une proportion de 40 p. 100. Cet effet négatif avait été déjà observé par différents auteurs [7, 8] et il est vérifié dans ce travail.

TABLEAU 5. — Effet de la combinaison benzoate de sodium - éthanol

p 100 éthanol (v/v)	p. 100 benzoate (p/v)	pH initial	Activité	Nombre de coliformes/ml	Nombre de <i>clostridium</i> /ml	Nombre de <i>bacillus</i> /ml
— (test)	—	5,9	4 000	10 ⁷		
3	0,5	6,15	2 200	4,6-10 ³		
3	1,0	6,15	3 800	150		
3	1,5	6,2	3 200	150		
3	2,0	6,15	3 050	46		
3	2,5	6,05	2 900	15		
3	3,0	6,2	2 600	—	20	100
5	0,5	5,95	4 700	1 500		
5	1,0	6,2	3 000	15		
5	1,5	6,15	2 500	—		
5	2,0	6,15	2 300	—		
5	2,5	6,2	2 600	—	60	400
10	1,0	4	3 900	—		
		(ajusté avec ClH)				
10	1,5	4	4 000	—		
		(ajusté avec ClH)				

Effets de l'éthanol et de la combinaison « acide borique - éthanol »

L'addition du 10 p.100 d'éthanol n'a pas donné une réduction satisfaisante dans le NPP de coliformes.

La puissance de l'effet entre l'éthanol et l'acide borique est restée totalement justifiée. Une concentration de 15 ml d'éthanol/100 ml de solution extractive et 5 g de $B(OH)_3$ /100 ml n'a pas été suffisante pour annuler totalement le développement des bactéries coliformes. On n'a pas cherché à essayer des concentrations plus élevées des deux conservateurs chimiques puisque le prix des additifs commençait déjà à représenter un facteur économique très considérable. Les résultats sont détaillés dans le tableau 2.

Effet de l'orthophosphate de sodium $12 H_2O$

La recherche de l'effet de conservateurs chimiques non traditionnels, tels que les orthophosphates et polyphosphates, a été effectuée à travers l'essai avec $PO_4Na_3.12H_2O$ dont les résultats sont notés dans le tableau 3. La concentration conseillée [2], de 5 g par 100 ml de solution extractive, avec et sans éthanol, a donné néanmoins une teneur de coliformes survivants assez élevée, et elle produisait, en même temps, une perte de l'activité enzymatique, dans l'extrait, de l'ordre de 20 à 30 p.100 par rapport au témoin.

Effet du benzoate de sodium

Les résultats des effets du benzoate de sodium sont détaillés dans le tableau 4. On a observé qu'une concentration de 2,5 g de benzoate/100 ml de solution extractive est suffisante pour arrêter complètement le développement des coliformes quand on réalise les extractions sans ajustement de pH initial. Mais un effet négatif apparaît sur l'activité enzymatique et cet effet produit des réductions jusqu'à 40 p.100 quand on emploie 3 p.100 de benzoate de sodium, par rapport au témoin correspondant.

Dans la deuxième série d'expériences ayant descendu le pH initial à la valeur 5, les résultats nous montrent qu'une concentration entre 2 et 2,5 p.100 de benzoate est convenable et, en même temps, on observe que la perte de la valeur coagulante diminue. Cette perte oscille entre 10 et 20 p.100.

Quand le pH a été ajusté à 4 avant de commencer les extractions, on a montré que 2 p.100 de benzoate sont suffisants pour inhiber les coliformes. Dans ce cas l'influence négative de l'accroissement de la concentration de benzoate apparaît de nouveau mais plus atténuée. Cela nous montre qu'il convient d'ajuster, préalablement à l'extraction, le pH à valeur 4. Cette valeur est presque la même que celle de l'activation de l'enzyme. Par cela on obtient une considérable récupération de l'activité enzymatique et, d'autre part, on arrive aussi à accentuer l'effet inhibiteur du benzoate sur les micro-organismes.

Effet de la combinaison d'éthanol et de benzoate de sodium

Les résultats obtenus dans cette série d'expériences, qui apparaissent dans le tableau 5, ont un caractère similaire à ceux qui ont été décrits auparavant, quant à la réalisation d'un effet synergétique entre l'éthanol et le benzoate de sodium sur le blocage du développement des coliformes dans des présures liquides, tel que démontré déjà en faisant la combinaison « éthanol-acide borique ». Du premier lot d'essais, qui ont été réalisés à pH normal, on déduit que 3 p. 100 d'éthanol et 3 p. 100 de benzoate donnaient un pourcentage nul de micro-organismes survivants. Néanmoins, ces conditions étaient inadéquates pour la récupération de l'activité enzymatique de l'ordre de 35 p. 100 par rapport à l'extraction à laquelle nous faisons référence. Après avoir réalisé une quantité d'extractions dans les mêmes conditions de pH que les extractions antérieures mais dont la concentration initiale d'éthanol était élevée à 5 p. 100, on a vérifié que l'on avait besoin seulement de la moitié de la quantité de benzoate ajoutée (1,5 p. 100) et la perte du pouvoir coagulant était la même (35-40 p. 100) que dans les essais précédents.

Finalement, l'ajustage initial du pH de l'extraction à une valeur 4 nous a montré les effets favorables cités : d'abord, qu'il n'y avait aucune perte d'activité enzymatique par rapport au témoin et puis, le besoin d'une basse concentration de benzoate (1 p. 100) pour empêcher totalement le développement des coliformes.

Quoi qu'il en soit, il est nécessaire d'élever la quantité d'éthanol additionné au commencement de l'extraction jusqu'à une concentration de 10 p. 100. D'après ce que nous avons dit dans l'énumération des objectifs de ce travail, on a essayé de détecter, dans quelques expériences, ce qui aurait donné un nombre nul de micro-organismes coliformes, de bactéries sporulées, aérobies et anaérobies. Ces résultats apparaissent dans le tableau 5 et nous montrent que l'inhibition des coliformes n'indique pas l'inhibition des sporulées. Le rapport entre ces deux objectifs fera l'objet d'un travail ultérieur.

V. CONCLUSION

1. De tous les conservateurs chimiques essayés, deux seulement, l'éthanol et le benzoate de sodium ont donné les résultats les plus intéressants et profitables pour parvenir à inhiber complètement l'activité microbienne des bactéries coliformes dans des présures liquides. Et ce sont aussi ces conservateurs chimiques-éthanol et benzoate de sodium qui empêchent, parallèlement, des pertes de pouvoir coagulant dans les extraits.

2. Les expériences réalisées démontrent que ces deux conservateurs sont nécessaires en de basses concentrations et que l'ajustage de pH à des valeurs proches de 4 est toujours avantageux avant de commencer les extractions car cet ajustage à 4 augmente positive-

ment l'activité antimicrobienne du benzoate, et ceci est approprié pour l'activation de l'enzyme pendant la macération des caillettes.

En résumé, 2 p.100 (p/v) de benzoate, sans addition d'éthanol, se révèle très efficace, ou bien il suffit seulement de 1 p.100 (p/v) de benzoate si on additionne 10 p.100 (v/v) d'éthanol.

Summary

The behavior of five chemical conservators used in the food industry usually, in front to the coagulant power and the presence of coliform bacteria in liquid rennet extracts of adult bovine abomasums, was studied.

The chemical additives analyzed, both isolated and combined, were : boric acid, ethanol, trisodium orthophosphate, sodium chloride and sodium benzoate.

It is concluded about the most adequate additive and the conditions in wich its effect is optimized.

Reçu pour publication, en août 1979.

Bibliographie

- [1] Codigo Bromatologico de la Provincia de Santa Fe. Republica Argentina. Editorial Colmegna, Santa Fe, Argentina.
- [2] FURIA (T. E.) (1972). — Handbook of Food Aditives. 2nd Edition. Clevelans Press, U.S.A.
- [3] HARRIGAN (W. F.) and Mc CANCE (M. E.) (1966). — Laboratory Methods in Microbiology. Academic Press, N.Y., 47, 146-297.
- [4] HUCK (J.) y ZALAZAR (C.) (1971-72). — Determinacion de las condiciones optimas de proceso para la produccion industrial de cuajo en polvo. I. Estudios preliminares. Rev. de la Facultad de Ing. Química, U.N.L. Santa Fe, Argentina, 40/1, 185-194.
- [5] IRAM (Argentina) (1970). — Norma N° 14057. Editado por el Instituto Argentino de Racionalizacion de Materiales. Buenos Aires, Argentina.
- [6] MERCK-DARMSTADT (1977). — Manual de Microbiologia. Alemania.
- [7] MICKELSEN (R.) and ERNSTROM (C. A.) (1967). — Factors affecting stability of rennin. *J. Dairy Sci.*, 50, 5, 645-650.
- [8] RAND (A. G.) and ERNSTROM (C. A.) (1968). — Activation of prorennin by pepsin. *J. Dairy Sci.*, 51, 11, 1756-1760.
- [9] RODRIGUEZ VILLANUEVA (J.) y GARCIA ACHA (J.) (1961). — Investigacion del modo de accion de las sustancias antimicrobianas. *Microbiologia Espanola*, 14, 59-64.
- [10] THATCHER (F. S.) y CLARK (D. S.) (1972). — Analisis microbiologico de los Alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza, Espana, 90-210.
- [11] VITORIA (J. C.) (1947). — Preparacion industrial de cuajo liquido. *La Industria lechera* : mayo, 308-332.
- [12] ZALAZAR (C. A.), RAMANZIN (M.) y REINHEIMER (J.) (1978). — Determinacion de las condiciones optimas de proceso para la produccion industrial de cuajo. II. Aspectos tecnologicos. Presentado a las XIV Sesiones Quimicas Argentinas. Santa Fe, 16-20 de julio.