

# Influencia de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* sobre las características fisicoquímicas y sensoriales del yogurt

## Influence of the *Fluorescens Pseudomons Bacterium* over the Physical-Chemical and Sensorial Characteristics of Yogurt

INGRID ZORAIDA BENAVIDES CAMACHO

Bacterióloga del Colegio Mayor de Cundinamarca y Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia.

NORMA CONSTANZA LÓPEZ ORTIZ

Química Farmacéutica y Magíster en Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Colombia. Profesora de tiempo completo, categoría Asistente, en el Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia.

nclopezo@unal.edu.co

LUZ PATRICIA RESTREPO SÁNCHEZ

Química y Magíster en Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Colombia. Profesora de tiempo completo, categoría Asociado, en el Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia.

lprestrepos@unal.edu.co

CARLOS FERNANDO NOVOA CASTRO

Zootecnista y Magíster en Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Colombia. Profesor, categoría Asistente, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos ICTA.

cfnovoac@unal.edu.co

Clasificación del artículo: investigación

Fecha de recepción: 9 de noviembre de 2005

Fecha de aceptación: 13 de octubre de 2006

**Palabras clave:** psicrotróficos, yogurt, características fisicoquímicas, sensoriales. *Pseudomonas fluorescens*.

**Keywords:** psychrotrophic, yogurt, *pseudomonas fluorescens*, sensory characteristics, chemical characteristics.

### RESUMEN

El uso generalizado de sistemas de almacenamiento de leche refrigerada ha traído como consecuencia el crecimiento de bacterias tolerantes al frío conocidas

como bacterias psicrotróficas; ellas son capaces de crecer entre 2 y 7° C, aunque su temperatura óptima de crecimiento sea de 20 a 30° C. La mayoría de este tipo de bacterias es destruida en la etapa de pasteurización, pero durante su desarrollo producen enzimas

termorresistentes que, en bajas concentraciones, son responsables del deterioro de productos lácteos durante su almacenamiento.

En este artículo se estudiaron los cambios en las características fisicoquímicas y sensoriales de un yogurt elaborado con leche inoculada con tres niveles de *Pseudomonas Fluorescens*, sometida a refrigeración durante seis días a 4°C y pasteurizada antes de elaborar el yogurt. Los resultados no muestran diferencias en las características fisicoquímicas del yogurt; en sus características sensoriales muestran diferencias en la aceptabilidad debido a la apariencia, color y textura, pero ellas no fueron suficientes para ocasionar el rechazo del producto por parte de los consumidores.

## ABSTRACT

The generalized use of refrigerated milk stock systems generates the cold tolerant bacteria growing, named *psicotropic bacteria*; they are able to grow

between 2 and 7 degrees Celsius (C), although their growing optimal temperature is between 20 and 30 degrees C. The majority of this type of bacteria is destroyed during the pasteurization stage; however, they produce thermal resistant enzymes during their growing which, in low concentration, are responsible of the damage of milk products during their stock.

In this paper, the changes in physical chemical and sensorial characteristics of a yogurt made with inoculated milk, with three levels of *Fluorescens Pseudomonas*, refrigerated during six days to 4 degrees C. and pasteurized before the elaboration process, was studied. The results do not show differences about the physical chemical characteristics of the yogurt; in relation to their sensorial characteristics there are differences in the acceptance because of the appearance, color and texture, but they was not enough to generate the product reject by the consumers.

\* \* \*

## 1. Introducción

Incluso cuando procede de animales sanos, la leche siempre contiene una serie de microorganismos cuyo recuento es muy variable ( $10^3 - 10^6$  UFC/mL); éste depende de las medidas higiénicas empleadas durante el ordeño y de las condiciones de almacenamiento en la finca, los centros lecheros y las plantas de producción. La cantidad y tipos de microorganismos que posee la leche cruda derivan de tres fuentes fundamentales: el interior y exterior de la ubre y el equipo de ordeño, incluyendo los utensilios de lechería; otras fuentes posibles de contaminación son el estiércol, la paja, el ensilado y el ordeñador [1].

Después de que la leche abandona la ubre queda expuesta a contaminaciones causadas por microorganismos que pueden ser psicrotróficos, mesófilos o termófilos; cada uno de ellos se desarrolla a diferentes temperaturas: los mesófilos a temperatura ambiente, los termófilos resisten los procesos de

pasteurización y los psicrotróficos siguen multiplicándose a temperaturas inferiores a 7°C. De esta forma, el almacenamiento de la leche a baja temperatura no garantiza que su contenido de gérmenes también sea bajo; además, los microorganismos son capaces de producir enzimas (proteasas y lipasas) termo-resistentes, que aún a bajas temperaturas provocan alteraciones bioquímicas de la leche o del producto lácteo derivado de ella [2-3].

En Colombia, el Ministerio de Salud define al yogurt como el producto obtenido a partir de leche higienizada, coagulada por la acción de las bacterias *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* y *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, que deben ser abundantes y viables en el producto final [4]. En un estudio realizado en ocho plantas procesadoras de leche cruda de Bogotá [5] se encontraron recuentos de psicrotróficos muy superiores al límite de conta-

minación fuerte ( $5 \cdot 10^6$  UFC/ mL); el recuento más bajo obtenido fue de  $92 \cdot 10^7$  UFC/mL. La presencia de bacterias psicrotróficas en productos lácteos pasteurizados no se considera normal y es indicativa de posible contaminación postpasteurización, causada por equipos mal aseados o saneados, o tratados con aguas de lavado contaminadas. El recuento de estas bacterias en la leche pasteurizada suministra información acerca de la bondad del tratamiento postpasteurización, y de la vida comercial del producto en condiciones de refrigeración.

Los cambios en el aroma y sabor que alteran la calidad de la leche y de los productos lácteos fermentados son consecuencia de la actividad lipolítica y proteolítica de microorganismos psicrotróficos, en especial de *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*). Ellos originan sabores extraños que pueden ser detectados sensorialmente luego de cinco días de almacenamiento a temperaturas de refrigeración. Los defectos más comunes son sabor frutal y amargo, sabores pútridos, rancios o a papa, que acompañan la degradación de las proteínas en péptidos y de estos en aminoácidos. Los sabores jabonosos y rancios son el resultado de la ruptura de lípidos en ácidos grasos como el butírico, caproico, caprílico, cáprico y láurico. Los sabores frutales son generados por la actividad lipolítica de los psicrotróficos en los productos lácteos; estos provienen de la esterificación de los ácidos grasos libres. Algunos microorganismos producen fosfolipasas (en especial fosfolipasa C) o lecitinasas que tienen una acción específica sobre el glóbulo graso, aumentando la susceptibilidad de la exposición de la grasa de la leche a la acción de las lipasas [6].

El presente artículo tiene como objetivo determinar el efecto del crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en la leche destinada a la elaboración de yogurt, sobre las características fisicoquímicas y sensoriales del producto elaborado.

## 2. Materiales y métodos

Se utilizó leche fresca cruda proveniente del hato de la Universidad Nacional de Colombia (Marengo),

donde predomina la raza *Holstein*. El estudio se desarrolló en tres fases:

- Caracterización inicial de la materia prima e inoculación de la cepa.
- Elaboración del producto lácteo fermentado (yogurt).
- Control de calidad del producto final mediante análisis fisicoquímico y sensorial.

Luego de realizar los análisis fisicoquímicos e higiénicos de calidad de la leche empleada como materia prima para la elaboración del yogurt aplicando la metodología de la *Association of Analytical Chemistry* [7], el contenido de materia grasa se estandarizó en un valor de 3,0%; en seguida la leche se homogenizó, pasterizó y se realizó un recuento en placa de microorganismos psicrotróficos presentes en la leche antes de la inoculación de *P. fluorescens*.

El líquido se dividió en tres lotes de 14 l de leche cada uno, que fueron inoculados con una suspensión de la cepa de *P. fluorescens* e identificados así:

- Lote 1, T1: (inóculo bajo o patrón, sin inóculo de *P. fluorescens*) con un recuento de psicrotróficos  $<10$  UFC/mL.
- Lote 2, T2: (nivel medio de inóculo) con un recuento de psicrotróficos aproximadamente de  $10^2$  UFC/mL.
- Lote 3, T3: (nivel alto de inóculo) con un recuento de psicrotróficos aproximadamente  $10^3 - 10^5$  UFC/mL.

Los lotes se refrigeraron a  $4^\circ\text{C}$  durante seis días, teniendo en cuenta que en épocas de abundancia de leche ésta debe almacenarse hasta por una semana en los tanques refrigerados. Al finalizar este periodo se hizo un recuento de microorganismos psicrotróficos usando el método de referencia de recuento en placa, en *Agar Plate Count*, por siembra en superficie. Los medios se incubaron durante diez días a  $7^\circ\text{C}$ , para determinar el conteo total de

psicrotróficos existentes en la leche de partida, de acuerdo con el método recomendado por el Instituto Nacional de Salud y la ICMSF [8]. Luego se elaboró el yogurt usando un cultivo láctico termófilo mixto que contenía *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, y se tomaron muestras alícuotas cada cinco días; en total, fueron realizados cinco muestreos, cada uno con los tres niveles de inóculo: T1, T2 y T3.

La última etapa del experimento fue evaluar la calidad del yogurt de los tres lotes. Para ello se realizaron las siguientes actividades:

- Caracterización fisicoquímica, reglamentada por la norma técnica colombiana respectiva [9].
- Análisis sensorial: mediante aplicación de una prueba analítica descriptiva de puntajes; este análisis fue realizado usando una escala compuesta, con la colaboración de ocho panelistas entrenados<sup>1</sup>.
- Prueba afectiva de aceptabilidad: usando una escala hedónica de nueve puntos [10] se evaluaron las características de sabor, aroma, textura y calidad total a partir de la opinión de 70 consumidores.

Los resultados obtenidos fueron tratados estadísticamente; se calculó la desviación estándar de los análisis fisicoquímicos realizados por triplicado; los resultados de la evaluación sensorial con el panel entrenado se obtuvieron mediante el método no paramétrico de Kruskal Wallis [11] para más de dos muestras; a los resultados de las pruebas afectivas se aplicó la prueba T de *Student*.

<sup>1</sup> Los panelistas eran integrantes del "panel de evaluación sensorial" del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá D.C., Colombia.

### 3. Resultados y discusión

A continuación, se presentan los resultados de los análisis fisicoquímicos y condiciones higiénicas de la leche cruda fresca.

La leche de partida cumplió con las condiciones de procesamiento exigidas para la leche fresca cruda [12]; los resultados se observan en la tabla 1. Los datos obtenidos de acidez titulable indican que no se ha iniciado un proceso de fermentación por acción bacteriana, que a futuro pueda afectar la calidad del producto final o imposibilitar el procesamiento. La leche cruda empleada se clasifica como higiénicamente buena, al establecerse un tiempo de reducción del azul de metileno mayor a seis horas. Los anteriores resultados, la prueba de ausencia de antibióticos con resultado negativo y la prueba de termoestabilidad de la leche reflejan en conjunto la excelente calidad de la materia prima empleada; ello es resultado del empleo de buenas prácticas en su obtención y transporte hasta la planta de lácteos.

Parámetro	Resultado
Materia grasa % m/m	3,0
Proteína % p/p	2,8
Extracto seco total % m/m	11,7
Extracto seco desengrasado % m/m	8,7
% acidez E.C.A.L. *	0,14
pH	6,8
Densidad a 15°C g/mL	1,032
Prueba de inhibidores	Negativa
Prueba de reductasa	6 horas
Prueba de termoestabilidad	Negativa

\* Expresada como ácido láctico

**Tabla 1.** Resultados de análisis fisicoquímicos realizados a la leche cruda fresca

#### 3.1 Resultados de análisis microbiológicos

El conteo fue menor a 10 UFC de microorganismos psicrotróficos/ mL de leche pasteurizada, lo que indica que el tratamiento térmico destruyó más del 99% de la población microbiana inicial, y que los recuentos posteriores a este tratamiento serán producto de la multiplicación y crecimiento expo-

nencial de la suspensión de *P. fluorescens* inoculada en la leche.

### 3.2 Análisis fisicoquímicos de la leche inoculada y refrigerada a 4 °C

Luego de los seis días de almacenamiento se realizaron las pruebas químicas cuyos resultados se muestran en la tabla 2. Se observa que no se presentaron cambios estadísticamente significativos debidos a la acción del inóculo de *P. fluorescens*, si se comparan con los resultados de las mismas pruebas realizadas a la leche cruda fresca. Estos resultados se explican porque las bacterias psicrotróficas no muestran la capacidad acidificante propia de las bacterias mesófilas, y que a 4°C su actividad es mínima, comparada con la existente a 7 y 10°C, como se reporta en [13]. Aunque son degradados por las enzimas microbianas, los componentes proteína y grasa dejan sus productos de hidrólisis en la leche, por lo cual el contenido de nitrógeno y de materia grasa permanece constante.

En la leche inoculada con un nivel alto de *P. fluorescens* se realizó un recuento de 10<sup>6</sup> UFC/mL; aunque éste fue el valor máximo, todos los parámetros fisicoquímicos de los tres lotes permanecieron dentro de los rangos permitidos para su procesamiento [12].

Análisis	T1	T2	T3
Materia grasa (% m/m)	3,0	3,0	2,9
Proteína (% p/p)	2,70	2,68	2,68
Extracto seco (%m/m)	11,24	11,24	10,90
% acidez E.C.A.L.*	0,15	0,15	0,15
pH	6,7	6,7	6,7
Densidad g/mL	1,032	1,032	1,032

\* Expresada como ácido láctico

**Tabla 2.** Resultados de los análisis fisicoquímicos realizados a la leche inoculada con *P. fluorescens*

### 3.3 Análisis microbiológico de la leche inoculada y refrigerada a 4°C

En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos en los recuentos respectivos; como se esperaba, a

medida que aumenta el nivel de inóculo existe un incremento en el número de unidades formadoras de colonias de microorganismos psicrotróficos.

Los anteriores resultados simulan tres situaciones con respecto al manejo de leche en los hatos ganaderos. El primero, un recuento con muy baja población microbiana, difícil de encontrar en la práctica, dado que la leche, luego de extraerse del animal, sufre diversas contaminaciones. El segundo, representa la situación más frecuente; indica buenas prácticas de manejo del líquido hasta la etapa de procesamiento. El tercer recuento corresponde a una franca contaminación del producto, dadas las inadecuadas condiciones de ordeño, manejo, almacenamiento y transporte de la leche; estos aspectos influyen en gran medida en la multiplicación de la tasa inicial de microorganismos psicrotróficos presentes en la materia prima.

Nivel de inóculo	Resultado (UFC /mL de leche de microorganismos psicrotróficos)
T1	17 x 10 <sup>1</sup>
T2	13 x 10 <sup>4</sup>
T3	32 x 10 <sup>6</sup>

**Tabla 3.** Recuento en placa de microorganismos psicrotróficos en la leche inoculada con *P. fluorescens*.

### 3.4 Análisis fisicoquímicos del yogurt durante el almacenamiento

#### • Acidez

Como se observa en la tabla 4, los valores del grado de acidez del yogurt—expresada como ácido láctico—muestran una tendencia a disminuir a medida que aumenta el nivel de contaminación, durante todos los tiempos de almacenamiento, probablemente debido a que los productos de hidrólisis de las proteínas y grasas tienen efecto sobre los cultivos lácticos. Estos resultados concuerdan con [13] y se producen a la misma temperatura de almacenamiento.

DÍA	% acidez (E.C.A.L)			pH		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
0	0,74	0,71	0,64	4,44	4,55	4,55
5	0,88	0,83	0,83	4,12	4,24	4,25
10	0,88	0,83	0,83	4,13	4,24	4,25
15	0,90	0,83	0,83	4,10	4,15	4,18
21	0,94	0,94	0,83	4,10	4,20	4,23

**Tabla 4.** Acidez y pH en el yogurt elaborado con leche inoculada con *P. fluorescens* durante el almacenamiento

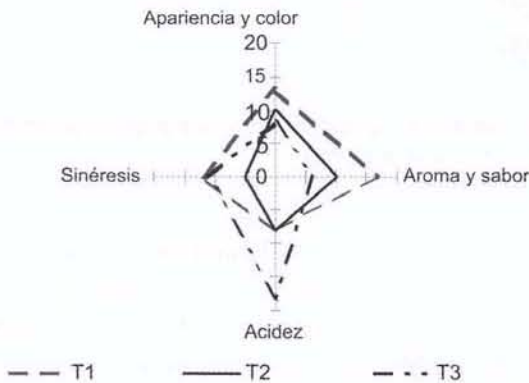
• *pH*

Los valores obtenidos se observan en la tabla 6; de acuerdo con los resultados no hay variaciones en el pH del yogurt por efecto del nivel de inóculo de *Pseudomonas fluorescens* durante el almacenamiento.

**3.5. Evaluación sensorial del yogurt**

• *Evaluación sensorial con el panel entrenado*

Las figuras 1 y 2 presentan los resultados obtenidos en la evaluación de calidad sensorial con el panel entrenado en los días cero y 21 de almacenamiento.



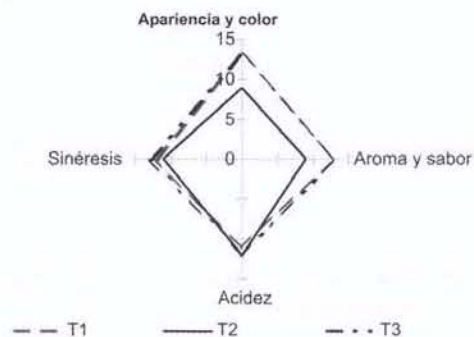
**Gráfico 1.** Perfil sensorial del yogurt en el día cero de almacenamiento.

En la gráfica 1 puede observarse que el nivel de calidad del atributo se incrementa al aumentar la distancia desde el origen. De acuerdo con los resul-

tados, se presentan diferencias significativas en los atributos de aroma y sabor y en la característica de acidez, y sinéresis entre las muestras de yogurt; tales diferencias son más notorias a medida que aumenta el nivel de inóculo de *P. fluorescens* en la materia prima. No obstante, contrario a lo esperado y según lo reportado, sobre que las bacterias psicrotróficas generan sabores amargos y astringentes [14] los cambios ocasionados tienden a mejorar las características sensoriales del yogurt. Es probable que los umbrales de los defectos del aroma y sabor que se pueden generar en la leche y en el yogurt debido al efecto del crecimiento de *P. fluorescens* a los niveles estudiados son altos, y no se alcanzaron a percibir por parte de los panelistas; asimismo, es probable que hayan resaltado los aromas y sabores que genera el cultivo láctico.

De acuerdo con lo expresado en la gráfica 2, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las tres muestras de yogurt, evaluadas sensorialmente. Sin embargo, se identifica una tendencia a obtener mejor puntuación para los atributos sensoriales de apariencia y color, aroma y sabor en la muestra de yogurt con mayor nivel de inóculo, en contradicción con lo reportado por algunos autores [15-16].

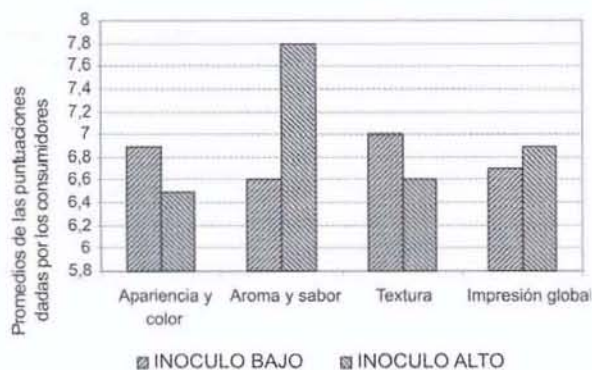
El yogurt con mayor nivel de inóculo recibe buena calificación, porque no se desarrolló el típico sabor a rancio o amargo, aunque sí se presenta una mayor acidez y una sinéresis, que pueden afectar la estabilidad del producto si se producen almacenamientos mayores a 21 días.



**Gráfico 2.** Perfil sensorial del yogurt, en el día veintiuno de almacenamiento

• *Evaluación sensorial con consumidores*

De acuerdo con los resultados mostrados en la gráfica 3, existen diferencias estadísticamente significativas entre la aceptación por atributos de las dos muestras de yogurt evaluadas sensorialmente por los consumidores. La muestra de yogurt con el tratamiento 1 de *P. fluorescens* tuvo mayor aceptación entre los consumidores en lo referente a sus atributos de apariencia, color y textura; al parecer, la presencia de sinéresis afecta la aceptación potencial de estos atributos. La muestra de yogurt con el tratamiento 3 tuvo mayor aceptación, en relación con los atributos de aroma, sabor e impresión global. Estos resultados demuestran que probablemente los aromas y sabores que se pudieron generar por efecto de la actividad de *P. fluorescens*, realzan los sabores propios del yogurt a los cuales el consumidor está habituado a percibir en productos lácteos fermentados. Además, la actividad enzimática a 4°C debida a de *P. fluorescens* a los niveles estudiados no disminuye la aceptación del yogurt. Según la literatura, la temperatura de almacenamiento de la materia prima tiene efecto sobre la producción de enzimas que finalmente afectan la calidad del producto [17].



**Gráfica 3.** Comparación de la aceptabilidad del yogurt elaborado con leche inoculada con niveles bajo y alto de *P. fluorescens*

De acuerdo con los resultados de la gráfica 4, el yogurt con nivel de inóculo alto de *P. fluorescens* presenta un 49% de aceptación entre los consumidores. Este alto porcentaje indica que a pesar de que las muestras evaluadas presentaron cambios

sensoriales estadísticamente significativos, al parecer no se afecta el grado de aceptación total del producto. Por tanto, en las dos muestras evaluadas se obtuvo una respuesta semejante.

Los resultados obtenidos con la refrigeración a 4°C de la leche luego de la inoculación con microorganismos psicrotróficos demuestran que esta baja temperatura parece influir sobre la producción y actividad enzimática, aunque los cambios ocasionados en el producto final no tienen gran influencia en la calidad total y aceptación del producto.



**Gráfica 4.** Porcentaje de aceptación del yogurt con niveles de inóculo bajo y alto de *P. fluorescens*

**4. Conclusiones**

Aunque se lograron crecimientos de 10<sup>6</sup> UFC/mL de *P. fluorescens* en la leche empleada para la elaboración de yogurt, esto es, una contaminación fuerte de la materia prima, el crecimiento de microorganismos psicrotróficos no causa alteraciones en las características fisicoquímicas de la leche cuando ésta se mantiene en refrigeración durante seis días a 4° C.

La inoculación de *P. fluorescens* en la leche empleada en la elaboración de yogurt afectó las características sensoriales de aroma y sabor, acidez y sinéresis durante su almacenamiento; sin embargo, estos cambios no produjeron el rechazo del producto por parte de los consumidores. El panel entrenado de evaluación sensorial no encontró diferencias en la calidad del yogurt preparado con un nivel de inóculo alto almacenado durante 21 días, aunque la tendencia fue otorgar una mejor calificación al yogurt preparado con leche con nivel de inoculación alto.

Aunque el grupo de consumidores que evaluó sensorialmente el yogurt elaborado a partir de leche inoculada con *P. fluorescens* notó pequeños cambios

en los atributos sensoriales de aroma, sabor y calidad total entre las dos muestras de yogurt, aceptó los dos productos dando puntuaciones similares.

---

## Referencias bibliográficas

---

- [1] Amito, A. (1991). *Ciencia y tecnología de leches. Principios y aplicaciones*. Ed. Acribia, España.
- [2] Robinson, R. (1987). *Microbiología lactológica*. Microbiología de los productos lácteos. Vol 2. Ed. Acribia, España.
- [3] Frazier, W.C. (1993). *Microbiología de los alimentos*. 4 ed., Ed. Acribia, España.
- [4] Ministerio de Salud. (1986) Resolución 2310. *Procesamiento, composición, requisitos, transporte y comercialización de los derivados lácteos*. Bogotá D.C.
- [5] Gámez, S. (1991). *Cuantificación de bacterias psicrótrofas en la leche cruda de ocho plantas procesadoras en Bogotá*. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- [6] Cousin, M. (1982) "Presence and Activity of Psychotropic Microorganisms in Milk and Dairy Products. A Review". *Journal of Food Protection* Vol. 45 (2).
- [7] Association of Analytical Chemistry, AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis*. 15a. ed.
- [8] Luna, G. (1998). *Manual operativo de Análisis Microbiológicos para Alimentos*. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Bogotá D.C.
- [9] NTC 805 (2000). *Productos lácteos. Leches fermentadas*. 3a. actualización. Bogotá. D.C.
- [10] Meilgaard, M; Civille, Gail, Carr, B.T; (1999). *Sensory Evaluation Techniques*. CRC Press. USA.
- [11] Conover, W. J. (1980) *Practical Nonparametric Statistics*. 2a. ed. John Wiley and Sons. New York.
- [12] Ministerio de Salud. (1983) Decreto 2437. *Producción, procesamiento, transporte y comercialización de la leche en Colombia*.
- [13] Novoa, C. (2006). *Actividad proteolítica de bacterias psicrótrofas y su influencia en la calidad de la leche como materia prima en la elaboración de quesos*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química
- [14] Sorhaug, T. and Stepaniak, L. (1997). "Psychrotrophs and their Enzymes in Milk and Dairy Products: Quality Aspects". *Trends in Food Science and Technology* (8).
- [15] Kholmman, K. L.; Nielsen, S.S; Steenson, L.R; and Ladisch, M. R., Production of Proteases by Psychotropic Microorganism. (1990). In: *Journal Dairy Science Association* (74).
- [16] Benedicho, S.; C. Giner, J. Barbosa Canovas, T. and Martin O. (2002). "Effects of High Intensity Pulsed Electric Field and Thermal Treatments on a Lipase from" *P. fluorescens*. *Journal Dairy Science Association* (85)
- [17] Costa, M.; Gómez, M.; Molina, L.; Romero, A., (2001). *Cinética de crecimiento y producción de proteasas de Pseudomonas fluorescens en leche cruda a temperaturas de refrigeración*: Archivos Latinoamericanos de nutrición, Vol. 51 (4)