

## DOSAGGIO DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA DELLE PROTEASI DEL LATTE BOVINO

Omar BULGARI<sup>1</sup>, Marco CAMPAGNARO<sup>1</sup>, Giuseppe BOLZONI<sup>2</sup>,  
Carmen GIGLIOTTI<sup>1</sup>, Anna Maria CAROLI<sup>1\*</sup>

### INTRODUZIONE

La *shelf-life* di un alimento è il tempo raccomandato per la conservazione del prodotto, ovvero il tempo durante il quale la qualità dell'alimento rimane accettabile per quanto riguarda gli specifici requisiti di distribuzione e conservazione [1]. La *shelf-life* del latte e derivati è influenzata dalla qualità del latte crudo: la conta microbica totale e le cellule somatiche determinano la carica di enzimi resistenti al calore. Sono di solito necessari elevati livelli di batteri psicotrofi nel latte crudo per la degradazione, dopo pastorizzazione, delle proteine e del grasso ad opera di proteasi e lipasi stabili al calore [2]. La interazione tra flora microbica del latte, principali lattoproteine ed enzimi proteolitici è di grande importanza nel determinare la qualità del latte.

L'idrolisi enzimatica delle proteine è un importante fattore nella produzione di un'ampia varietà di alimenti. Può avere effetti favorevoli su sviluppo di sapori e sul cambiamento della tessitura durante la maturazione dei formaggi. Tuttavia, una proteolisi non controllata e indesiderata può condizionare in modo negativo la qualità degli alimenti [3]. La proteolisi delle lattoproteine può essere causata sia dalle proteasi native del latte, sia da proteasi prodotte da batteri psicotrofi [4-6]. Queste proteasi provocano modificazioni benefiche o deleterie, a seconda del prodotto specifico cui il latte è destinato.

Un elevato contenuto di proteasi nel latte può determinare, durante la conservazione del latte dopo trattamento termico, la formazione di gel e di precipitati, a scapito delle caratteristiche organolettiche e nutrizionali del latte stesso. Al contrario, per la produzione di formaggi, le proteasi possono avere un effetto favorevole sullo sviluppo di caratteristiche sensoriali e organolettiche durante la maturazione, conferendo importanti elementi di tipicità al prodotto caseario [7]. Le proteasi tagliano le proteine a livello del legame peptidico tra il gruppo amminico di un amminoacido e il gruppo carbossilico di quello adiacente, tramite idrolisi enzimatica.

Le proteasi presenti nel latte possono essere distinte in esogene ed endogene. Le proteasi esogene, prodotte da psicotrofi, sono generalmente metalloproteine, in

---

\* *Corrispondenza ed estratti:* caroli@med.unibs.it

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie. Viale Europa 11, 25123 Brescia.

<sup>2</sup> Centro di Referenza Nazionale Qualità Latte Bovino - IZSLER. Via Bianchi 9, 25124 Brescia.

quanto necessitano della presenza di uno ione metallo come il calcio per ottimizzare la loro attività [8]. Gli psicrotrofi sono microrganismi che crescono a  $\leq 7$  °C, nonostante la loro temperatura di crescita ottimale sia maggiore. Durante la refrigerazione del latte hanno un ruolo predominante sulla flora microbica e sono responsabili di numerosi problemi nei prodotti lattiero-caseari. In buone condizioni igieniche, meno del 10% della totale microflora è rappresentata da psicrotrofi, rispetto ad un valore superiore al 75% in condizioni non igieniche [9]. Le proteasi prodotte dagli psicrotrofi sono attive ad un ampio *range* di pH e di temperatura [8]. Esse sono estremamente stabili al calore, sopportando processi di temperatura ultraelevata. Attaccano tutte le forme di caseina, con idrolisi preferenziale per la k-caseina, seguita da  $\beta$ -caseina, e, in minor misura, dalle frazioni  $\alpha_s$  [5, 10]. L'idrolisi della k-caseina può risultare nella destabilizzazione della micella caseinica, con produzione di piccoli frammenti peptidici e sviluppo di sapori amari [11].

La plasmina, principale proteasi nativa del latte, è una proteasi serinica in quanto l'amminoacido serina è il suo sito attivo [12]. È presente nel latte primariamente nella sua forma inattiva, il plasminogeno. Plasminogeno e plasmina sono stabili al calore. Al contrario, gli attivatori e gli inibitori del plasminogeno come pure gli inibitori della plasmina sono sensibili al calore [13-15]. La plasmina idrolizza  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - e  $\beta$ -caseina, mentre presenta scarsa o nulla attività sulle sieroproteine [12, 16, 17]. La plasmina è stabile ed attiva a un ampio *range* di pH, come indicato in parte dalla sua attivazione in diversi tipi di formaggio [15]. La plasmina del latte bovino e l'attività della plasmina hanno migliorato il sapore e la qualità di alcuni formaggi [18-21]. L'importanza della plasmina durante la maturazione del formaggio dipende dalle temperature di cottura durante la caseificazione e dal pH durante la maturazione del prodotto [22, 23].

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di applicare un metodo colorimetrico alla valutazione delle proteasi totali in campioni di latte bovino aziendali e individuali prodotti in provincia di Brescia. Il metodo, descritto in letteratura, è stato ottimizzato e standardizzato per rispondere meglio alle esigenze di laboratorio e alle caratteristiche del latte prodotto nella nostra provincia. Lo studio è stato preliminare ad una più ampia indagine sul territorio bresciano, volta a identificare biomarcatori innovativi di particolare interesse per la valutazione delle caratteristiche qualitative, tecnologiche e nutrizionali del latte.

#### MATERIALI E METODI

Per la valutazione dell'attività proteasica totale del latte è stato utilizzato il metodo descritto da Bendicho *et al.* [24]. Tale metodo, di tipo colorimetrico, utilizza come substrato l'azocaseina, la quale, posta in opportune condizioni di pH e di temperatura, viene degradata dalle proteasi presenti nel latte permettendo così il dosaggio dell'attività proteolitica del latte stesso. Più precisamente, la degradazione dell'azocaseina libera il gruppo cromoforo, di colore rosso quando è legato, in modo covalente, alla caseina e incolore quando è libero in soluzione.

L'intensità del colore ottenuto dalla reazione viene quantificata per via spettrofotometrica effettuando la lettura a 345 nm. La concentrazione del cromoforo è direttamente proporzionale all'attività delle proteasi presenti nel campione.

La soluzione tampone è composta da disodio idrogenofosfato 5mM (Anala R BDH, BH15 1 TD England) e sodio diidrogenofosfato 5 mM (Riedel-DE Haen AG Seelze-Hannover), nella quale viene disciolta l'azocaseina all'1% (Azocasein Sigma, Aldrich, Steinheim, Germany), pesata tramite bilancia analitica (Sartorius, Ghiaroni & C, Buccinasco, MI). La soluzione ottenuta viene miscelata con agitatore magnetico Micro Stirrer (VELP Scientifica, Usmate MI). Una volta solubilizzata l'azocaseina, la soluzione viene portata, con acido fosforico 8,5% (Analyticals, Farmitalia Carlo Erba, Milano), a un pH finale pari a 7,2 misurato tramite pHmeter BasiC 20 (Crison, Tecno-lab, Brescia).

Per ogni campione di latte vengono prelevati 400 µL ai quali vengono aggiunti 4 mL di soluzione contenente azocaseina all'1%. La reazione avviene per un periodo di incubazione di 15 minuti a 35,5°C in agitazione a 40 rpm con l'utilizzo di un bagnetto termostato Shaking Water Bath (BS-06 Lab. Companion, Oxon England). La reazione viene interrotta dall'aggiunta di 8 mL TCA al 5% (Sigma, Aldrich, Steinheim, Germany) e successiva centrifugazione a 4000 rpm a temperatura ambiente (Allegra™ Centrifuge Beckman Coulter; Fullerton USA). Il surnatante contiene il gruppo cromogeno liberato tramite taglio proteolitico per l'azione delle proteasi sull'azocaseina, mentre nel precipitato saranno presenti i componenti del latte e la quota di azocaseina non degradata.

I surnatanti vengono filtrati con carta Whatman 2 (Sigma, Aldrich, Steinheim, Germany). Infine si effettua la lettura colorimetrica tramite uno spettrofotometro UV-VIS (Jasco V-530, Tokyo) alla lunghezza d'onda di 345 nm. I valori ottenuti vengono quantificati tramite confronto con la curva di calibrazione. La standardizzazione del metodo ha previsto la valutazione del limite di rivelabilità e della linearità mediante la preparazione di opportune soluzioni standard di proteasi, e successivo approntamento della curva di calibrazione. Sempre in tale ambito, è stata anche valutata la ripetibilità del metodo.

Come attività enzimatica di riferimento viene utilizzata la proteasi N estratta da *Bacillus subtilis* (6,67 U/mg Fluka Analytical, Aldrich, Steinheim, Germany). L'attività è stata testata utilizzando un campione di latte intero, scelto tra alcuni campioni di latte precedentemente analizzati con il metodo in esame, e caratterizzato da un valore di assorbanza molto basso. Per ottenere la soluzione madre sono stati disciolti 0,3 g di proteasi in 30 mL del latte di riferimento. I punti della curva sono stati ottenuti tramite diluizioni seriali della soluzione madre con lo stesso latte intero, in modo da avere quattro concentrazioni progressive di proteasi (Tab. 1).

È stata inoltre effettuata la curva in acqua distillata, in modo da confrontare i risultati delle due curve (in latte e in acqua) e verificare l'eventuale presenza di un effetto matrice.

Tabella 1 – Valori di concentrazione di proteasi N (*Bacillus subtilis*) utilizzati per i 4 punti della curva di calibrazione.

Table 1 – Concentration values of N protease (*Bacillus subtilis*) used for the 4 calibration curve points.

Punto	mU/mL	mg/mL
Point	mU/mL	mg/mL
1	10,42	0,00156
2	20,84	0,00313
3	31,26	0,00469
4	41,68	0,00625

Sono stati analizzati 20 campioni di latte aziendali e 40 campioni di latte individuali prodotti da bovine di razza Frisona Italiana della provincia di Brescia. I campioni sono stati forniti dall'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), presso i cui laboratori vengono condotte routinariamente le analisi per la valutazione delle principali caratteristiche qualitative del latte.

Infine, è stata condotta l'analisi dei dati mediante il programma EXCEL e il pacchetto statistico SAS (SAS 9.1, SAS Institute, 1999). I confronti tra le medie delle attività proteasiche del gruppo di campioni aziendali e di quelli individuali sono stati effettuati mediante la procedura GLM del SAS.

#### RISULTATI E DISCUSSIONE

La tabella 2 riporta i risultati relativi alle curve di calibrazione dell'attività proteasica su acqua e su latte, effettuate mediante aggiunta di proteasi N estratta da *Bacillus subtilis*. I valori ottenuti per la curva nel latte sono superiori a quelli ottenuti in acqua, con una differenza media pari a 0,0038 mg/mL, imputabile all'effetto matrice che il latte presenta rispetto all'acqua.

La curva di calibrazione relativa alla matrice latte è riportata nella figura 1. Si tratta di una curva di regressione quadratica che presenta un valore del coefficiente di determinazione molto vicino a 1 ( $R^2 = 0,9979$ ). L'equazione di regressione ottenuta:

$$Y = -0,3846X^2 + 0,1062X [a]$$

è stata utilizzata per calcolare i valori di proteasi attesi in base ad una selezione di valori di assorbanza.

Per ottenere i valori di previsione è stato corretto il valore di assorbanza considerando la possibilità di ottenere un valore minimo di 0,09 per la matrice latte, dal momento che valori analoghi sono stati osservati nelle indagini successive.

Tabella 2 – Risultati ottenuti relativamente alle curve di calibrazione dell'attività proteasica in acqua distillata e latte.  $\Delta$  = media - valore medio del bianco (\*).

*Table 2 – Results obtained for the calibration curves of the protease activity in distilled water and milk.  $\Delta$  = mean - blank mean value (\*).*

Curva in H <sub>2</sub> O (valori di assorbanza, nm)					
<i>Curve in H<sub>2</sub>O (absorbance values, nm)</i>					
Proteasi mg/mL	Abs_1	Abs_2	Abs_3	Media	$\Delta$
<i>Protease mg/mL</i>	<i>Abs_1</i>	<i>Abs_2</i>	<i>Abs_3</i>	<i>Mean</i>	<i><math>\Delta</math></i>
0,00000*	0,0898	0,0881	0,0901	0,0893*	0,0000
0,00156	0,1023	0,1036	0,1018	0,1026	0,0132
0,00313	0,1189	0,1193	0,1193	0,1192	0,0298
0,00469	0,1401	0,1375	0,1428	0,1401	0,0508
0,00625	0,1570	0,1595	0,1626	0,1597	0,0704

Curva in latte (valori di assorbanza, nm)					
<i>Curve in milk (valori di assorbanza, nm)</i>					
proteasi mg/mL	Abs_1	Abs_2	Abs_3	Media	$\Delta$
<i>protease mg/mL</i>	<i>Abs_1</i>	<i>Abs_2</i>	<i>Abs_3</i>	<i>Mean</i>	<i><math>\Delta</math></i>
0,00000	0,0993	0,0973	0,0950	0,0972*	0,0000
0,00156	0,1157	0,1148	0,1130	0,1145	0,0173
0,00313	0,1304	0,1325	0,1285	0,1305	0,0333
0,00469	0,1472	0,1479	0,1517	0,1489	0,0517
0,00625	0,1798	0,1777	0,1774	0,1783	0,0811

Tale valore è stato quindi considerato come assenza di attività proteasica nei campioni di latte intero. L'equazione di regressione [a] è stata così adattata per la previsione dell'attività proteasica del latte:

$$Y = (-0,3846X^2 + 0,1062X + CA) * CM [b]$$

dove:

Y = attività proteasica prevista (mU/mL)

X = valore di assorbanza osservato - 0,0972

CA = coefficiente additivo (+0,00078) per azzerare il contenuto di proteasi del latte al valore di assorbanza di 0,09.

CM = coefficiente moltiplicativo (6679,487) per trasformare mg/mL in mU/mL.

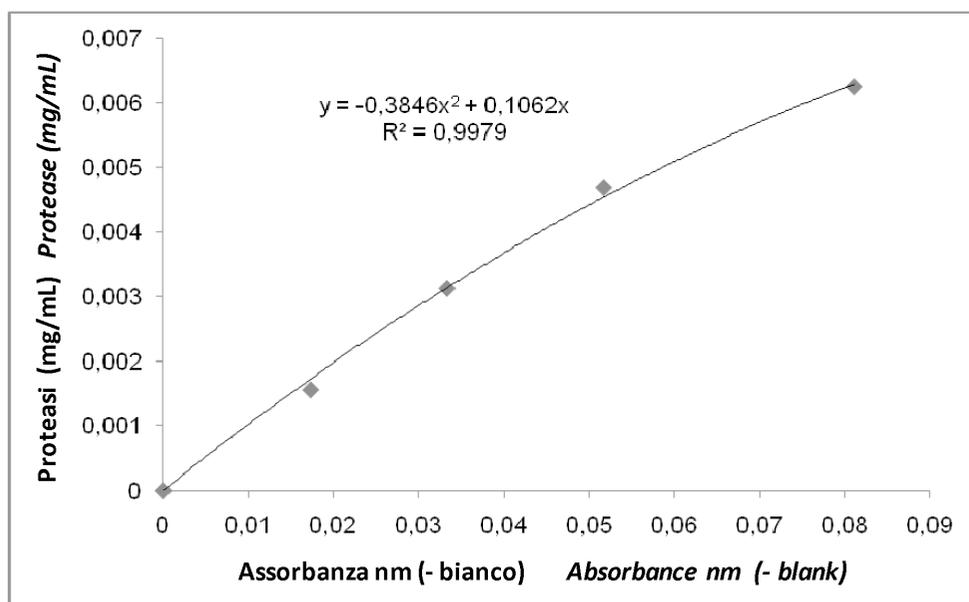


Figura 1 – Curva di calibrazione dell’attività proteasica in latte riferita al valore di assorbanza ottenuta per differenza dal bianco del latte (Abs = 0,0972 nm).

*Figure 1 – Calibration curve of the protease activity in milk referred to the absorbance value obtained by difference from milk blank (Abs = 0.0972 nm).*

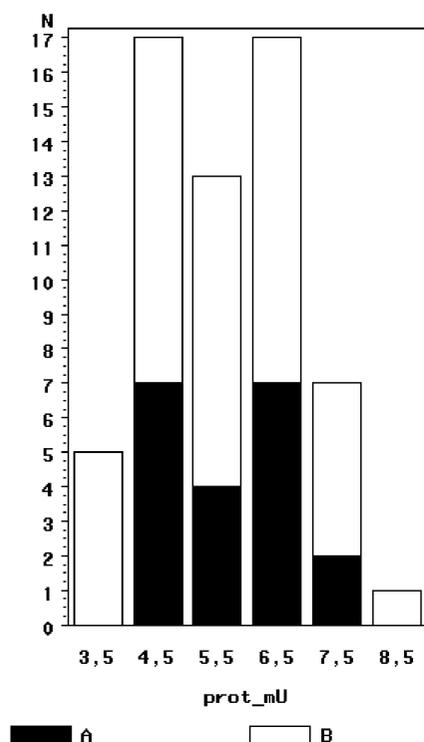
Il limite di rilevabilità del metodo è risultato molto basso e pari a 0,735 mU/mL. Anche la ripetibilità, espressa come 100 - coefficiente di variazione, è risultata pari a 98,5% e quindi buona, in accordo con la variabilità legata alla valutazione di un’attività biologica.

La tabella 3 riporta le statistiche descrittive relative al dosaggio dell’attività proteasica nei 60 campioni analizzati. I valori medi di entrambe le variabili (Abs e Prot\_mU) non differiscono in modo significativo tra campioni di latte aziendali e individuali, come indicato dal valore di probabilità associato al confronto mediante t di Student ( $P > 0,6$ ).

La distribuzione delle variabili nei due campioni è rappresentata graficamente nella figura 2, relativa al valore predetto di attività proteasica. Per entrambe le variabili, si nota una maggior variabilità nei campioni di latte individuali. Questo fatto può essere dovuto sia al maggior numero di campioni analizzati nel data-set “individuale”, sia a caratteristiche peculiari legate ai singoli soggetti. Inoltre, per entrambe le campionature e per entrambe le variabili, la distribuzione di frequenza è alquanto bimodale, a indicare una possibile sovrapposizione di due sotto-popolazioni.

Tabella 3 – Statistiche descrittive dei valori di assorbanza (Abs, nm) e dell'attività proteasica (Prot\_mU, mU/mL) ottenuti nel data-set generale (Intero), nei campioni aziendali (Aziendale) e in quelli individuali (Individuale). Dev Std = deviazione standard.  
*Table 3 – Descriptive statistics of the absorbance values (Abs, nm) and protease activity (Prot\_mU, mU/mL) obtained in the whole data-set (Whole), herd samples (Herd), and individual samples (Individual). Std Dev = standard deviation.*

Data-set	Variabile	N	Media	Dev Std	Minimo	Massimo
<i>Data-set</i>	<i>Variable</i>	<i>N</i>	<i>Mean</i>	<i>Std Dev</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
Intero	Abs	60	0,098	0,002	0,094	0,102
Whole	Prot_mU	60	5,598	1,149	3,228	8,373
Aziendale	Abs	20	0,098	0,001	0,096	0,100
Herd	Prot_mU	20	5,693	1,016	4,140	7,384
Individuale	Abs	40	0,098	0,002	0,094	0,102
Individual	Prot_mU	40	5,551	1,220	3,228	8,373



#### CONCLUSIONI

Il metodo colorimetrico per il dosaggio dell'attività proteasica del latte utilizzato, si è dimostrato di facile applicazione e può essere indicato per un monitoraggio su ampia scala delle proteasi totali dei campioni di latte aziendali e individuali. La bimodalità osservata, per quanto riguarda la distribuzione delle variabili, merita ulteriori approfondimenti al fine di individuare eventuali fattori di variabilità che differenzino le due sotto-popolazioni ipotizzate.

Ci si attende che l'utilizzo di questa metodica, attualmente in atto su ampia scala nell'ambito del progetto BIOLAT

Figura 2 – Distribuzione di frequenza dei valori di attività proteasica (prot\_mU; mU/mL) nella campionatura aziendale (A) e individuale (B).

*Figure 2 – Frequency distribution of the protease activity values (prot\_mU; mU/mL) in the herd (A) and individual (B) samples.*

(Regione Lombardia), possa dare indicazioni di interesse per l'identificazione di biomarcatori idonei al miglioramento qualitativo della produzione di latte bovino, con particolare riferimento alle sue caratteristiche tecnologiche e nutrizionali.

**RIASSUNTO** – Il sistema proteico del latte è un elemento di fondamentale importanza sia dal punto di vista della qualità nutrizionale del latte, sia per le evidenti implicazioni sulle caratteristiche tecnologiche del latte. Si tratta di un sistema dinamico: le lattoproteine sintetizzate dalle cellule mammarie sono sottoposte all'azione di enzimi proteolitici, con importanti ripercussioni su aspetti tecnologici e nutrizionali del latte. L'idrolisi enzimatica delle proteine può avere effetti favorevoli su aspetti quali lo sviluppo di sapori e i cambiamenti della tessitura durante la maturazione dei formaggi. Tuttavia, una proteolisi indesiderata può condizionare in modo negativo la qualità del latte e derivati e la *shelf-life* degli stessi. Nel presente lavoro è stato applicato un metodo colorimetrico per la valutazione delle proteasi totali in campioni di latte bovino aziendali e individuali. Il metodo, che utilizza come substrato l'azocaseina, è stato ottimizzato e standardizzato per rispondere alle esigenze di laboratorio e alle caratteristiche del latte prodotto in provincia di Brescia. Tale metodo colorimetrico si è dimostrato di facile applicazione e può essere indicato per un monitoraggio su ampia scala delle proteasi totali in campioni di latte aziendali e individuali. Sono stati analizzati preliminarmente 20 campioni di latte aziendale e 40 campioni di latte individuale, ottenendo un'attività media di proteasi pari a 5,6 mU/mL, con una deviazione standard di 1,1 mU/mL, un valore minimo di 3,2 mU/mL e un valore massimo di 8,4 mU/mL.

*Parole chiave:* latte bovino, proteasi totali, attività enzimatica

**SUMMARY** – *Quantification of bovine milk total protease activity.*– Milk protein system exerts a crucial role from the point of view of both milk nutritional quality and technological properties. It is a dynamic system: milk proteins synthesised by the mammary cells undergo the action of proteolytic enzymes with important effects on milk quality. Milk protein enzymatic hydrolysis can favourably affect flavour development and texture changes during cheese ripening. However, unwished proteolysis can have a negative effect on both dairy product quality and shelf-life. A colorimetric method was used to quantify total proteases in bovine herd and individual samples. The method, based on azocasein substrate, was optimised and standardised for fitting laboratory conditions and analysed milk characteristics. It is a cheap and easily applicable method and can be used for routine milk tests. A preliminary analysis was performed on 20 herd and 40 individual milk samples. The protease mean activity was 5.6 mU/mL (standard deviation = 1.1 mU/mL; *minimum* value = 3.2 mU/mL; *maximum* value = 8.4 mU/mL).

*Keywords:* bovine milk, total proteases, enzymatic activity

*Ringraziamenti:* Ricerca eseguita con Finanziamento BIOLAT, Regione Lombardia.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) Gyesley SW (1991). *Total systems approach to predict shelf life of packaged foods*. ASTM STP 1113-EB.
- 2) Barbano DM, Ma Y, Santos MV (2006). *Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life*. J. Dairy Sci., 89, E15–E19.
- 3) Nielsen SS (2002). *Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles, and relationship*. J. Agric. Food Chem., 50, 6628-6634.
- 4) Kitchen BJ (1985). *Indigenous milk enzymes*. In: *Developments in Dairy Chemistry-3*; Fox, PF, Ed.; Applied Science Publishers: London, U.K.
- 5) Fairbairn DJ, Law BA (1986). *Proteinases of psychrotrophic bacteria: Their production, properties, effects and control*. J. Dairy Res., 53, 139-177.
- 6) Miranda G, Gripon J C (1986). *Origine, nature et incidences technologiques de la proteolyse dans le lait*. Lait, 66, 1-18.
- 7) Coker CJ, Crawford RA, Johnston KA, Singh H, Creamer LK (2005). *Towards the classification of cheese variety and maturity on the basis of statistical analysis of proteolysis data - a review*. Int. Dairy J., 15, 631-643.
- 8) Mitchell GE, Ewings KN (1985). *Quantification of bacterial proteolysis causing gelation in UHT-treated milk*. N. Z. J. Dairy Sci. Technol., 20, 65-76.
- 9) Suhren G (1989). *Producer microorganisms*. In: *Enzymes of Psychrotrophs in Raw Foods*. McKellar RC, Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, pp 3-34.
- 10) Cox JM (1993). *The significance of psychrotrophic Pseudomonas in dairy products*. Aust. J. Dairy Technol., 4, 108-113.
- 11) Cromie S (1992). *Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk*. Aust. J. Dairy Technol., 47, 96-100.
- 12) Grufferty MB, Fox PF (1988). *Milk alkaline proteinase*. J. Dairy Res., 55, 609-630.
- 13) Richardson BC (1983). *The proteinases of bovine milk and the effect of pasteurization on their activity*. N. Z. J. Dairy Sci. Technol., 18, 233-245.
- 14) Lu DD, Nielsen SS (1993). *Heat inactivation of native plasminogen activators in bovine milk*. J. Food Sci., 58, 1010-1016.
- 15) Bastian ED, Brown RJ (1996). *Plasmin in milk and dairy products: an update*. Int. Dairy J., 6, 435-457.
- 16) Caessens PWJR, Daamen WF, Gruppen H, Visser S, Voragen AGJ (1999). *Beta-Lactoglobulin hydrolysis. 2. Peptide identification, SH/SS exchange, and functional properties of hydrolysate fractions formed by the action of plasmin*. J. Agric. Food Chem., 47, 2980-2990.
- 17) Caessens PWJR, Visser S, Gruppen H, Voragen AGJ (1999). *Beta-Lactoglobulin hydrolysis. 1. Peptide composition and functional properties of hydrolysates obtained by the action of plasmin, trypsin, and Staphylococcus*

- aureus V8 protease. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2973-2979.
- 18) Bastian ED, Brown JR, Ernstrom A (1991). *Casein interference in bovine plasmin assays using a synthetic substrate*. *J. Dairy Sci.*, 74, 4119-4124.
  - 19) Farkye NY, Fox PF (1992). *Contribution of plasmin to Cheddar cheese ripening: effect of added plasmin*. *J. Dairy Res.*, 59, 209-216.
  - 20) Farkye NY, Landkanner CF (1992). *Milk plasmin activity influence on Cheddar cheese quality during ripening: effect of added plasmin*. *J. Food Sci.*, 57, 622-639.
  - 21) Bastian ED, Lo CG, David KMM (1997). *Plasminogen activation in cheese milk: Influence on Swiss cheese ripening*. *J. Dairy Sci.*, 80, 245-251.
  - 22) Fox PF (1989). *Proteolysis during cheese manufacturing and ripening*. *J. Dairy Sci.*, 72, 1379-1400.
  - 23) Farkye NY, Fox PF (1990). *Observations on plasmin activity in cheese*. *J. Dairy Res.*, 57, 412-418.
  - 24) Bendicho S, Martì G, Hernandez T, Martìn O. (2002). *Determination of proteolytic activity in different milk systems*. *Food Chem.*, 79, 245-259.