

CATEDRA DE INDUSTRIAS DE LA LECHE, CARNE Y PESCADO

Profesor Encargado de Curso: Dr. F. Rejas García

**Contribución al Estudio de algunos factores que
influencian a la nisina en la prevención de la
hinchazón butirica de los quesos**

por F. Rejas García

En el último decenio son muy numerosas las investigaciones que sobre el papel que puede jugar la nisina en la lucha contra la hinchazón tardía de los quesos, han realizado numerosos autores extranjeros y españoles. Ante lo sugestivo del tema, y por la importancia que tiene en la industria quesera, hemos querido aportar nuestro grano de arena en estas investigaciones, tocando algunos puntos poco investigados, o aquellos que puedan tener algún interés para la industria quesera española.

En la redacción de este trabajo, haremos en primer lugar una somera revisión de las investigaciones realizadas por diversos autores, y a continuación daremos cuenta de los resultados por nosotros conseguidos.

Historia de la nisina.—La nisina es una substancia inhibitoria para diversos microorganismos, producida por *Strep. lactis* del grupo N. Los efectos de esta substancia fueron observados por primera vez en 1933 por WHITEHEAD y RIDDET en Nueva Zelanda. Más tarde MEANWELL (1943) en Inglaterra aisló diversas cepas productoras en la leche y equipo lechero. Por fin en 1944 MATTICK y HIRSCH *aislaron* esta substancia y la denominaron nisina, y en 1952 la casa inglesa Aplin y Barret Lda. patentó los procedimientos de fabricación industrial.

En estos últimos años han sido realizadas más amplias investigaciones por el Instituto Nacional de Investigaciones Lecheras de Reading (Inglaterra); por HIRSCH; BERRIDGE; NEWTON y ABRAHAM; LILLEY; CHEVALIER, FOURNAUD, LAFEBVRE y MOCQUOT; y otros.

Naturaleza y propiedades.—La nisina es un polipeptido, con un peso molecular de alrededor de 10.000, compuesto por los siguientes aminoácidos: Leucina, valina, alanina, glicina, prolina, ácido aspártico, histidina, lisina, ácido glutámico, serina, metionina, lantionina y alantionina. Posee un espectro antimicrobiano no demasiado amplio, en el que se incluyen numerosas especies del género *Clostridium*.

Es escasamente soluble en agua, ligeramente en tampones a pH 4,2-5,6, y amplia y rápidamente en ácido clorhídrico 0,02M.

Es bastante estable al calor, y en medios ácidos, la alcalinidad, sin embargo la afecta bastante. En medio proteico a 100° C. son necesarias, para la completa desactivación, dos horas a pH 8, una hora a pH 9 y 30 minutos a pH 10. A pH 2 resisten perfectamente 100° C durante 30 minutos, y después de una hora a pH 6 solamente se desactiva el 25 por ciento.

Es completamente atóxica, y debido a su sensibilidad a la ptialina, a su digestión o la tripsina, a su destrucción por numerosos lactobacilos, estreptococos y levaduras, y a su inestabilidad a pH 7, hace que apenas afecte a la flora intestinal al ser ingerida en los productos lácteos.

Empleo de la nisina en la lucha contra la hinchazón tardía de los quesos.—La hinchazón tardía de los quesos es una alteración de los mismos producida por los *Cl. butyricum* y *tirobutyricum*, que se caracteriza por un abombamiento más o menos tardío del queso, en general cuando por la maduración del mismo el pH de la pasta se encuentra próximo a la neutralidad. El abombamiento es producido por el gas formado a partir de la lactosa y lactatos.

En el queso pueden aparecer otras alteraciones motivadas por clostridios, podredumbre y putrefacciones, de las cuales es responsable el *Cl. sporógenes*, colaborando con él otros diversos clostridios, *Cl. putrefaciens*, *Cl. sphenoïdes*, *multifermantans*, etc.

En numerosas ocasiones en los quesos puede existir un desarrollo no demasiado amplio de clostridios, sin alteraciones demasiado manifiestas, por lo que pudiera a primera vista inducir al consumo de

estos quesos; debemos pensar sin embargo que son numerosas las cepas tóxicas de clostridios encontradas en el queso.

Para evitar el desenvolvimiento de clostridios en los quesos se han seguido dos directrices. O bien evitar que la leche se contamine por los mismos, o intentar su destrucción en la leche contaminada y evitar su desenvolvimiento en el queso.

La primera directriz ha sido seguida en diversas zonas queseras de algunos países europeos, eliminando las fuentes de contaminación de la leche en la granja, prohibiendo la alimentación con forrajes ensilados y realizando un ordeño higiénico.

En la segunda, se han empleado diversos artificios con más o menos éxito. Vamos a pasar una breve revista a los más importantes.

La pasterización de la leche, incluso a temperaturas superiores a 100°, no ha resuelto el problema, porque no existe garantía de la total destrucción de los esporos, porque crea al eliminar el oxígeno un verdadero ambiente anaerobio, facilitando la germinación de los esporos no destruidos, y finalmente, porque al producirse una fuerte alteración de las proteínas la estructura del queso será deficiente y con una fuerte pérdida de sabor y aroma.

Se ha ensayado una reducción del pH y la adición de diversas sales. La reducción del pH a niveles suficientes es incompatible con la calidad del queso, y la adición de sales crea serias dificultades en el proceso de fabricación.

El uso de agentes oxidantes, agua oxigenada, superfosfatos, bromatos, nitratos, cloratos y cloritos, ha sido propugnado por diversos investigadores. Tienen el inconveniente de que pueden ser tóxicos y de que su uso está prohibido por las diversas legislaciones.

Finalmente, en este último decenio, numerosos investigadores en diversos países europeos, Alemania, Holanda, Dinamarca, Austria, Suiza, Italia, Grecia y España, han utilizado la nisina en la lucha contra el abombamiento tardío de diferentes quesos, Emmenthal, Gruyere, Edam, Gouda, Tilsit, Parmesano, Grana, Manchego, y otros, aparte de los quesos fundidos.

La nisina puede utilizarse en forma cristalizada o bien mediante la incorporación a la leche de cepas de *Strp. lactis* productoras de nisina. Parece ser que son suficientes concentraciones de 80 a 150 unidades Reading por gramo de queso, para protegerle suficientemente contra la contaminación butírica.

La desactivación de la nisina en los quesos es pequeña y a largo plazo, y puede ser activa indefinidamente sino existen gérmenes desactivamente, o si el pH no es superior a siete.

Los gérmenes desactivamente de la nisina son muy diversos. En los quesos naturales los que más importancia tienen son determinadas especies de lactobacilos, y casi todos los *Streptococcus lactis* no productores de nisina. El *Lact. casei* parece ser que a veces protege a la nisina de su desactivación por el *Lact. plantarum*, aunque otras no deja que actue sobre los clostridios, sin llegar a desactivarla. En los quesos fundidos los gérmenes desactivantes más frecuentes son los *Strep. faecalis*.

De primera impresión parece que la nisina sólo ofrece ventajas en la lucha contra la hinchazón tardía, y que no presenta ningún inconveniente. Sin embargo, es preciso hacer constar que son numerosas las especies productoras de ácido láctico, estreptococos y especialmente lactobacilos, que son inhibidas por la nisina, lo cual puede dar lugar a deficientes e incorrectas fermentaciones en los quesos. Este punto parece ser que ha sido obviado mediante la incorporación a la leche de cepas de lactobacilos resistentes a la nisina, las cuales pueden ser adquiridas en los laboratorios preparadores (Aplin y Barred Ltd.).

PARTE EXPERIMENTAL

Los objetivos que nos marcamos al iniciar este trabajo, fueron, intentar averiguar el modo de acción de la nisina frente a los clostridios, la influencia del método peróxidocatalásico, tan empleado en España en la leche destinada a quesería, sobre la actuación de la nisina, y la influencia que las sales fundantes más comunes pudieran tener sobre la actuación de este antibiótico, en vista a su aplicación en los quesos fundidos.

Para ello trabajamos con nisina, amablemente facilitada para estos ensayos por su laboratorio preparador Aplin y Barred Ltd., y con dos cepas de *Cl. butíricum*, una procedente de la ATCC, y otra aislada por nosotros de un queso abombado.

Preparación de las soluciones de nisina.—Hemos podido comprobar la escasa solubilidad de la nisina en agua destilada, e incluso en tampon a pH 4,5. Sin embargo, como se solubiliza perfectamente, en concentraciones de 1.000 g. por c. c., en solución 0,02 M de ácido clor-

hídrico, todas las soluciones de nisina que hemos tenido que realizar para desarrollar este trabajo, se han hecho en este disolvente previamente esterilizado.

Técnica de trabajo.—Las dos cepas de *Cl. butíricum* se han cultivado sobre AC medium Difco, con el que se obtienen cultivos luxuriantes en 48-72 horas.

Las pruebas se han realizado sobre leche estéril, leche natural, y en algunos casos sobre Fluid thioglicolate medium Difco. En todos, sobre un volumen de 20 c. c., en tubos de ensayo de 18 por 180 mm.

Una vez agregado el antibiótico al medio, y sembrado, se homogeneiza abundantemente con pipeta estéril, al objeto de que tanto el antibiótico como el germe queden ampliamente distribuidos. Se ensayó en un principio la regeneración del medio por ebullición en baño maría después de la homogeneización. Como los resultados eran idénticos si se suprimía esta operación adoptamos esto último en las técnicas de trabajo.

La siembra se realizó con dos gotas de cultivo, de 96 horas de edad, y con un 90 por ciento aproximadamente de células esporuladas y el resto en forma vegetativa. Como en ensayos previos, las dos cepas tienen un comportamiento muy semejante, la siembra se realizó con una mezcla de los dos cultivos a partes iguales.

Concentración inhibitoria y forma de inhibición.—El *Cl. butíricum* provoca en la leche estéril una alteración manifiesta, con producción de gas, coagulación y digestión parcial de coagulo posteriormente. Sobre el medio thioglicolato, produce un crecimiento característico con producción abundante de gas.

La dosis inhibitoria de estas alteraciones fue determinada con concentraciones de antibiótico intermedias entre uno y 300 μ g/cc., la concentración inhibitriz de crecimiento bacteriano y alteraciones en la leche es de 250 μ g/cc., mientras que para el medio thioglicolato fue suficiente 1 μ g/cc.

Estos resultados nos hicieron pensar en una posible desactivación o inhibición del antibiótico en presencia de la leche. Para comprobarla, previa puesta a punto de una técnica de valoración turbidimétrica de la nisina, pudimos observar que inmediatamente de disolver nisina en leche estéril, en concentración de 100 μ g/cc., solamente se detecta el 50 por ciento, y con un tiempo de contacto de 24 horas solamente el 10 por ciento. El por qué de esta desactivación nos es desconocido, y si nos es posible averiguarlo, será motivo de otra publicación.

En la valoración, inspirándonos en las investigaciones de Ber-ridge, empleamos el método turbidimétrico, con una cepa de *Strep. agalactiae* de nuestra colección como germen sensible, cultivando sobre Penassay broth Difco en baño maría a 37° y realizando la lectura en Lumetron a una edad de incubación de una hora. Es preciso (Fig. 1) realizar la lectura como máximo a la hora de incubación, si deseamos obtener curvas de transmisión lo más rectas posibles, a fin de evitar errores de valoración.

Sobre la forma de inhibición por la nisina de las alteraciones en la leche estéril sembrada con *Cl. buticum* hemos podido comprobar (Tabla I) que cuando no existe alteración manifiesta el desarrollo bacteriano es nulo, y que cuando la leche está alterada el crecimiento bacteriano es idéntico en todas las concentraciones de nisina. Solamente se puede advertir un ligero retardo en la manifestación de las alteraciones, con idéntico crecimiento bacteriano, cuando la concentración de nisina es próxima a la concentración inhibitoria. Estos resultados nos hacen suponer, contrariamente a otras opiniones (KOSIKOWSKI y MOCQUOT), que la nisina actúa sobre el *Cl. buticum*, inhibiendo su crecimiento pero sin afectar al metabolismo proteico e hidrocarbonado del mismo. (La determinación del crecimiento se ha realizado por el método de Breed, previa homogeneización por turmidización de la muestra).

Influencia del método peróxidocatalásico sobre la acción de la nisina.—En vista del gran interés que presenta el método peróxidocatalásico de Rosell en el tratamiento de la leche destinada a quesería, y a que su práctica aumenta de día en día en nuestra Patria, hemos querido investigar la influencia que pudiera tener sobre la acción de la nisina.

La técnica de trabajo fue la que sigue. Se utilizó H_2O_2 de 120 V, en concentración al 0,2 por ciento sobre leche estéril y natural, con tiempos de actuación entre una y tres horas. Posteriormente fue totalmente desdoblada por medio de catalasa, preparada por nosotros a partir de cultivos de *propionibacterium*, y a continuación se sembró con el *Cl. buticum* y se le incorporó la nisina.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas II y III.

De ellas se deduce que no existe influencia alguna del método peróxidocatalásico sobre la acción de la nisina.

Sin embargo de la tabla III se pueden obtener conclusiones muy sugestivas. En efecto, se observa, en todos los casos que se agrega nisina a la leche natural, estéril o no tratada con H_2O_2 , y estéril o no inoculada con

Cl. buticum, que aparece una fermentación totalmente diferente a la conseguida en la leche natural sin nisina estéril o no sembrada con *Cl. buticum*, y totalmente diferente a la clásica del *Cl. buticum* sobre leche estéril. Se comprueba, además, que en todos los casos de fermentación anormal con coincidencia de presencia de nisina en la leche, la flora microbiana de la misma es rica en gémenes diversos y pobre en estreptococos y lactobacilos. Por el contrario, cuando la nisina está ausente de la leche, la flora microbiana final es rica en estreptococos y lactobacilos y muy pobre en gémenes diversos. Estos fenómenos parecen indicar que la presencia de nisina inhibe el crecimiento de estreptococos y lactobacilos lácticos, actuando entonces el resto de la flora microbiana de la leche que se manifiesta con coagulación de la misma, formación de gas, y digestión del coágulo.

La inhibición del *Cl. buticum* en esta experiencia, suponemos sea debida a la rápida y fuerte acidificación del medio por la flora normal de la leche. Para comprobarlo realizamos un ensayo sobre la influencia del pH de la leche en la inhibición del *Cl. buticum*. Trabajamos con leche estéril acidificada posteriormente con ácido láctico a los pH deseados. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IV, y de ella se puede deducir que es suficiente un pH de 6,25 para inhibir las alteraciones de la leche y el crecimiento bacteriano.

Influencia de las sales fundentes sobre la acción de la nisina.—Al propugnarse el empleo de la nisina en la preservación de hinchazones butíricas de los quesos fundidos, hemos deseado comprobar si las sales fundentes clásicas, fosfato bisódico y citrato sódico, influenciaban o no la acción de la nisina frente al *Cl. buticum*.

Para ello hemos trabajado sobre leche estéril, a la que se adicionó las sales fundentes estériles, y con una concentración de nisina de 100 $\mu g/cc.$, más baja de la concentración inhibitoria.

Los resultados se muestran en las tablas V, VI y VII. Y de ellas podemos deducir que el fosfato bisódico actúa, aunque con poca intensidad, sinérgicamente con la nisina, ya que es suficiente un uno por ciento del mismo con 100 $\mu g/cc.$ de nisina para inhibir el crecimiento bacteriano y las alteraciones, mientras que es necesaria una concentración del tres por ciento de fosfato bisódico para que por si solo sea capaz de provocar la inhibición.

El citrato sódico, sin embargo, actúa con más intensidad sinergizando la acción de la nisina, ya que es suficiente una concentración

del 0,1 por ciento con 100 μ g/cc. de nisina para inhibir crecimiento y alteración. Por si solo se necesitan concentraciones del 0,5 por ciento.

Utilizando las dos sales fundentes a partes iguales, se observa, tabla VII, que la fuerte acción inhibitoria del citrato se encuentra fuertemente disminuida por la acción del fosfato, necesitándose concentraciones de la mezcla de las dos sales del uno por ciento con 100 μ g/cc. de nisina para eliminar el crecimiento bacteriano y la alteración. Por si sola es necesaria una concentración del tres por ciento para lograr los mismos efectos.

TABLA I

ACCION DE LA NISINA SOBRE LECHE ESTERIL SEMBRADA CON
CL. BUTIRICUM

Nisina μ g/cc.	48 h.	Incubación a 37°		Crecimiento bacteriano a las 96 h.
		72 h.	96 h.	
100	G	GCD	GCD	++
150	G	GCD	GCD	++
200	N	G	GCD	++
250	N	N	N	—
300	N	N	N	—

N = Normal. G = Gas. C = Coagulación. D = Digestión del coágulo

TABLA II

INFLUENCIA DEL METODO PEROXIDOCATALASICO SOBRE LA
NISINA (Leche estéril con *Cl. butiricum*)

Tratamiento H_2O_2 - Horas	Nisina μ g/cc	Incubación a 37°		Crecimiento bacteriano 72 h.
		48 h.	72 h.	
1	100	GCD	GCD	++
1	—	GCD	GCD	++
2	100	GCD	GCD	++
2	—	GCD	GCD	++
3	100	GCD	GCD	++
3	—	GCD	GCD	++
—	100	GCD	GCD	++
—	—	GCD	GCD	++

TABLA III

INFLUENCIA DEL METODO PEROXIDOCATALASICO SOBRE LA
ACCION DE LA NISINA. (Leche no estéril)

Horas tratamiento H_2O_2	Nisina μ g/cc	Siembra <i>Cl. buti- ricum</i>	Incubación a 37°			Crecimiento bacteriano		
			24 h.	48 h.	72 h.	Estrepto- cocos	Lactoba- cilos	Germen- es diversos
3	100	+	GA-C-D	GA-C-D	GA-C-D	+	+	++++
3	—	+	C	C	C	++++	++	+
—	100	+	GA-C-D	GA-C-D	GA-C-D	+	+	++++
—	100	—	GA-C-D	GA-C-D	GA-C-D	+	+	++++
—	—	+	C	C	C	++++	++	+
—	—	—	C	C	C	++++	++	+

GA = Gas atípico.

TABLA IV

INFLUENCIA DEL pH EN LA ALTERACION DE LA LECHE POR
EL *CL. BUTIRICUM*. (Leche estéril acidificada con ácido láctico)

pH inicial	Incubación a 37° 73 h.	Crecimiento bacteriano	pH Final
6,40	GCD	++	5,20
6,25	N	—	6,15
6,00	N	—	6,05
5,75	N	—	5,80
5,50	N	—	5,55
5,25	N	—	5,30
5,00	N	—	5,15

TABLA V

INFLUENCIA DEL FOSFATO BISODICO SOBRE LA ACCION DE LA
NISINA. (Leche estéril sembrada con *Cl. butericum*)

Nisina μ g/cc	Fosfato bisodico % /o	pH inicial	Incubación a 37°			pH 96 h.	Crecimien- to bacte- riano	Observa- ciones
			24 h.	48 h.	72 h.			
100	0,1	6,8	N	G	GCD	GCD	5	++
—	0,1	6,8	N	GCD	GCD	GCD	4,95	++
100	0,5	6,95	N	N	GC	GCD	5	++
—	0,5	6,95	N	GCD	GCD	GCD	4,95	++
100	1	7,1	N	N	N	N	6,5	—
—	1	7,1	N	GC	GC	GC	5,20	++
100	3	7,3	*	*	*	*	6,9	* alterada por fosfato id. id.
—	3	7,3	*	*G	*G	*G	5,90	
100	6	7,5	*	*	*	*	7,20	id. id.
—	6	7,5	*	*	*	*	7,30	

* alterada
por fosfato
id. id.

TABLA VI

INFLUENCIA DEL CITRATO SODICO SOBRE LA ACCION DE LA
NISINA. (Leche estéril sembrada con *Cl. butericum*)

Nisina μ g/cc	Citrato sódico % /o	pH inicial	Incubación 37°				pH 96 horas	Crecimien- to bacte- riano
			24 h.	48 h.	72 h.	96 h.		
100	0,1	6,75	N	N	N	N	6,40	—
—	0,1	6,75	N	GCD	GCD	GCD	5,00	++
100	0,5	6,95	N	N	N	N	6,45	—
—	0,5	6,95	N	G	G	GC	5,10	++
100	1	7,05	N	N	N	N	6,50	—
—	1	7,05	N	G	G	G	5,25	+
100	3	7,30	N	N	N	N	6,80	—
—	3	7,30	N	N	N	N	6,80	—
100	6	7,35	N	N	N	N	6,90	—
—	6	7,35	N	N	N	N	6,90	—

TABLA VII

INFLUENCIA DEL FOSFATO BISODICO Y CITRATO SODICO
SOBRE LA ACCION DE LA NISINA

(Leche estéril sembrada con *Cl. butericum*)

Nisina μ gr/cc	Fosfato bisodico % /o	Citrato sódico % /o	pH inicial	Incubación a 37°				pH 96 h.	Crecimien- to bacte- riano	Observa- ciones
				24 h.	48 h.	72 h.	96 h.			
100	0,05	0,05	6,75	N	N	GCD	GCD	4,90	++	
—	0,05	0,05	6,75	N	GCD	GCD	GCD	5,0	++	
100	0,25	0,25	6,90	N	N	G	GCD	5,05	++	
—	0,25	0,25	6,90	N	G	GCD	GCD	5,10	++	
100	0,5	0,5	7,05	N	N	N	N	6,50	—	
—	0,5	0,5	7,05	N	G	G	G	5,30	+	* altera- da por fosfato id. id.
100	1,5	1,5	7,40	*	*	*	*	6,80	—	
—	1,5	1,5	7,40	*	*	*	*	6,70	—	
100	3	3	7,60	*	*	*	*	7,0	—	id. id.
—	3	3	7,60	*	*	*	*	7,0	—	id. id.

RESUMEN

Se ha realizado un estudio experimental de la acción de la nisina frente al *Cl. buticum*, investigando diversos factores que pueden influenciar el empleo de este antibiótico en la lucha contra la hinchazón tardía de los quesos naturales y fundidos.

Se ha comprobado que la nisina actúa impidiendo la reproducción bacteriana, pero no afecta al metabolismo hidrocarbonado de la célula.

La concentración de antibiótico inhibitoria del desenvolvimiento bacteriano es diversa y en dependencia con el medio cultivo utilizado. En leche son necesarias concentraciones 250 veces más altas que en medios de cultivo para anaerobios, posiblemente debido a una desactivación o inhibición del poder antibiótico de la nisina en contacto con la leche, ya que por valoración turbidimétrica nos ha sido imposible detectar más del 10 por ciento de la nisina puesta en contacto con leche estéril durante 24 horas.

Se ha comprobado la influencia del método peroxidocatalásico sobre la acción de la nisina, no apareciendo acción sinérgica alguna. Por el contrario, las sales fundentes, fosfato bisódico y citrato sódico, actúan sinérgicamente con el antibiótico, levemente la primera y con gran intensidad la segunda.

RESUME

On a effectué une étude expérimentale sur l'action de la nisine contre le *Cl. buticum* et l'on a examiné les différents facteurs qui peuvent influencer l'emploi de cet antibiotique dans la lutte contre le gonflement butyrique des fromages naturels et fondus.

On a constaté que la nisine agit en empêchant la reproduction bactérienne mais elle n'affecte pas le métabolisme hydrocarboné de la cellule.

La concentration d'antibiotique inhibitoire du développement bactérien est variable et dépend du milieu de culture utilisé. Dans le lait, il est nécessaire employer des concentrations 250 fois plus élevées que dans les milieux de culture employés pour des anaérobies; cela est dû probablement à une desactivation ou inhibition de la force antibiotique de la nisine en contact avec le lait, puisqu'il nous a été impos-

ssible de détecter, au moyen d'une détermination turbidimétrique, plus d'un 10 % de la nisine mise en contact avec du lait stérile pendant 24 heures.

On a constaté aussi l'influence de la méthode peroxyde-catalase sur l'action de la nisine, sans qu'il y ait eu aucune action synergique. Au contraire, le sels de fonte, le phosphate bisódico et le citrato sódico agissent synergiquement avec l'antibiotique, légèrement le premier et avec grande intensité le second.

SUMMARY

We have carried out an experimental study on the action of nisine against the *Cl. buticum* and examined the various factors which may influence the use of this antibiotic in the strife against the clostridial blowing of original and processed cheese.

It has been found that nisine operates counteracting the bacterial reproduction but it does not affect the hydrocarbonaceous metabolism of the cell.

The inhibitory antibiotic concentration of the bacterial development is variant and it depends on the culture medium used. In milk it is necessary to use concentration 250 times higher than those used in culture media for anaerobes; this is probably due to a desactivation or inhibition of the antibiotic strength or capacity of nisine which is in contact with the milk, as we have not been able through a turbidimetric titration, to detect more than a 10 % of the nisine in contact with sterile milk for 24 hours.

The influence of the peroxide-catalase-method on the action of nisine has also been found, without any synergic action present. On the contrary, the fluxing salts, bisodic phosphate and sodic citrate operate synergically with the antibiotic, slightly the former and with great intensity the latter.

BIBLIOGRAFIA

- BERRIDGE, N. J., 1949.—*Biochem. J.*, 45,486.
BERRIDGE, N. J., 1952.—*Nature*, Lond. 169,707.
BERRIDGE, N. J. y BARRET, J., 1951.—*Nature*, Lond. 167,448.
BERRIDGE, N. J., NEWTON, G. C. F. y ABRAHAMM, E. P., 1952.—*Biochem. J.*, 52,529.

- CHEVALIER, R., FOURNAUD, J. y MOSQUOT, G., 1956.—14 Congr. Inter. Lech., Roma 3,44.
- COMPARE, C., 1960.—Rev. Esp. Lech., 35,7.
- HAWLEY, H. B., 1955.—J. appl. Bact., 18,383.
- HIRSCH, A., 1950.—J. gen. Microbiol., 4,70.
- HIRSCH, A., 1951.—J. gen. Microbiol., 5,208.
- HIRSCH, A. y GRINSTED, E., 1954.—J. Dairy Res., 21,101.
- HOOD, E. G. y SMITH, K. N., 1951.—Sci. Agric., 31,530.
- KOSIKOWSKI, F. V. y MOCQUOT, G., 1958.—Recientes avances en la Tecnología del queso., F. A. O., Roma.
- MATTICK, A. T. R. y HIRSCH, A., 1944.—Nature, Lond., 154,551.
- MCCLINTOCK, M., SERRES, L., MAROZLF, J. J., HIRSCH, A. y MOCQUOT, G., 1952.—J. Dairy Res., 19,187.
- ROGERS, L. A., 1928.—J. Bact., 16,321.
- ROSELL, J. M. y MATALLANA, D. S., 1956.—14 Congr. Inter. Lech. Roma, 2,479.
- ROSELL, J. M. y GOMEZ, 1960.—Manual de análisis lactológicos y fabricación de quesos y mantecas. La Coruña.
- SAVINI, E., 1947.—Il formaggio di Grana. Lodi.
- WEISER, H. H. 1942.—J. Bact., 43, 46.

