

según lo antes detallado. El TRIS se utilizó a una concentración de 0.05 M - NaCl 0.1 M a pH 7.4 y, en el caso del citrato de sodio, se empleó una concentración de 0.5 M y 2%. Se decidió realizar esta evaluación ya que los autores anteriormente citados que trataron la muestra con citrato lo utilizaron cada uno de ellos a diferentes concentraciones, siendo las ensayadas las más comunes.

Como resultado de la centrifugación en la macrocentrífuga, se obtuvo un sistema trifásico constituido por un sedimento donde se encontraba el residuo caseoso del queso, una fase acuosa intermedia y una superior constituida por un tapón de materia grasa.

El tapón de materia grasa fue más importante en el queso que fue tratado con citrato, lográndose así una mejor separación de la fracción grasa del queso. La turbidez originada por ésta interfiere en la lectura espectrofotométrica.

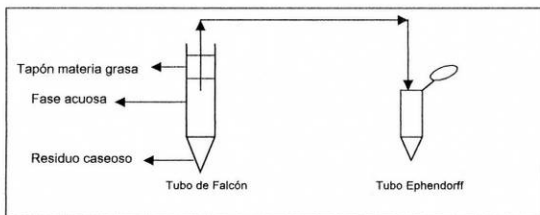


Fig. IV.5 . Esquema de procesamiento de la muestra

Se retiró este tapón graso y se tomó 1 ml. del sobrenadante el que se transfirió a un tubo eppendorff y se centrifugó en la microcentrífuga durante cinco minutos a 14.000 r.p.m.(Figura IV.5).

A fin de evaluar la cantidad de plasmina extraída (como absorbancia) en cada caso, se usó la reacción colorimétrica descrita, utilizándose como extracto para la reacción 25µl. del sobrenadante final .

En todos los casos se leyó contra blanco de muestra y se observó que se obtenía una mejor extracción de plasmina (mayores absorbancias) utilizando como buffer el citrato de sodio, tal como se observa en la tabla IV.1 .

Buffer	Abs.Muestra (M-B)	Buffer	Abs.Muestra (M-B)	Buffer	Abs.Muestra (M-B)
Citrato 0,5M	0,194	Citrato 2%	0,165	TRIS 0,05M -NaCl	0,110
	0,189		0,160		0,105

Tabla IV.1. Tratamiento de la muestra con Citrato 0.5M, al 2 % y con TRIS 0,05 M – NaCl.

A raíz de que el buffer citrato produjo mejores valores de absorbancia que el buffer TRIS y estos valores fueron superiores para la concentración 0,5M de citrato, se adoptó esta última concentración, que por otra parte es la que se utiliza habitualmente en el PROLAIN en el procesamiento del queso para diferentes determinaciones. Estas observaciones junto a lo desarrollado en el punto IV.3.1. refuerzan la necesidad de utilizar citrato en el procesamiento de las muestras.

Otro ensayo realizado, y con el objetivo de verificar la incidencia de la cantidad de muestra sobre la reacción de determinación de plasmina, se duplicó y triplicó la cantidad de queso ensayada, el tratamiento de muestra se realizó según lo antes descrito, se utilizó la misma metodología de cuantificación (IV.3.2) y por triplicado cada vez.

Para 5 y 10 gramos se obtuvo el mismo resultado por gramo de queso, siendo un poco mayor cuando se triplicó la cantidad de muestra. Todos los ensayos se realizaron con su correspondiente blanco de muestra y la ligera turbiedad del blanco correspondiente al uso de 15 g. pudo ser la causa de esta pequeña diferencia. Si bien no se observó incidencia sobre los resultados debido

a la cantidad de muestra utilizada, en el presente trabajo se emplearon muestras de 5 gramos de queso. Sin embargo, teniendo en cuenta estos resultados, en lugar de utilizar esta cantidad de muestra, se puede partir de una mayor cantidad en aquellos quesos donde se puede presuponer una baja actividad de plasmina a los efectos de tener una mejor lectura espectrofotométrica.

Es de destacar entonces que al duplicar y triplicar la cantidad de muestra, se duplico y triplicó la cantidad de plasmina, extrayéndose en todos los casos porcentajes cercanos a 100.

Los resultados obtenidos se observan en la Tabla IV.2.

Cantidad Muestra (g.queso)	$\mu\text{g.plasmina/ml}$ (media \pm DS)	$\mu\text{g.plasmina/g.queso}$
5	4,03 \pm 0,26	12,09
10	8,28 \pm 0,28	12,42
15	13,87 \pm 0,35	13,87

Tabla IV.2. Valoración de plasmina en cantidades crecientes de queso.

En otro ensayo de recuperación se trabajó con otra muestra de queso a la que se adicionó una cantidad conocida de solución patrón de plasmina.

Para tal fin se tomaron 5 gramos de queso, que se procesaron según lo descrito y se determinó la plasmina presente en el mismo de acuerdo a la metodología implementada (IV.3.2).

Paralelamente, a 5 gramos del mismo queso se le adicionaron 625 $\mu\text{l.}$ de la solución madre de plasmina con la que se realizó la curva de calibrado (160 $\mu\text{g.plasmina/ml}$). El queso con la adición estándar de la plasmina se procesó de la misma forma que la muestra sin adición.

Los resultados obtenidos se observan en la siguiente tabla:

	$\mu\text{g. plasmina} / \text{ml}$	
Queso	4,33	64,95 $\mu\text{g. plasmina}/15 \text{ ml}$
Queso + plasmina	10,40	162,5 $\mu\text{g plasmina}/15,625 \text{ ml}$

Tabla IV. 3. Ensayo de recuperación .

Siendo el valor de plasmina adicionada de 100 $\mu\text{g.}$ se deduce que el porcentaje de recuperación fue cercano al 100% .

Finalmente, con todos los ensayos precedentes se corrobora la eficiencia de la técnica desarrollada (IV.3.2), justificando su adopción en este trabajo.

IV. 3. 5. Curvas de calibrado:

La concentración de plasmina se expresó bajo dos formas diferentes. Una, en forma indirecta, como los miligramos de p-nitroanilina formada por gramo de queso; otra como microgramos de plasmina por gramo de queso. Para ello se realizaron dos curvas de calibrado, una con una solución de p-nitroanilina (Pro-Análisis, Bruxellas-r.c.b 85.078) y otra con una solución de plasmina (Sigma Chemical Co.,P-7911).

IV. 3. 5. a. Curva de calibrado con p-nitroanilina:

Con la finalidad de tener una primera aproximación a los valores de absorbancias de la p-nitroanilina liberada por acción de la plasmina en los distintos tipos de quesos a analizar, se efectuó una prueba con muestras de quesos que debían presentar los valores de enzima supuestamente más bajos y más altos: quesos no cocidos y cocidos respectivamente. Se utilizó el método

colorimétrico descripto para esta evaluación, se leyó contra blanco de muestra, obteniéndose las absorbancias que se señalan en la tabla IV.4.

Tipo de queso	Absorbancia
Queso cocido (Reggianito)	0.290
Queso no cocido (Q. Blanco)	0.078

Tabla IV.4. Lecturas de absorbancias de queso cocido y no cocido (λ :390)

Se preparó una solución 1,44 mM de p-nitroanilina en buffer TRIS 0,05M - NaCl 0,1M, ajustando el pH a 7,4.

Obtenidos estos valores de absorbancia en los quesos para ambas situaciones extremas, y con la finalidad de evaluar si la solución preparada de p-nitroanilina se encontraba dentro de este rango, se tomaron cuatro volúmenes, se los llevó cada uno de ellos a 10 ml y se leyó la absorbancia a 390 nm; los resultados se presentan en tabla IV.5 .

ml p-nitroanilina (1,44 mM)	$\mu\text{g.p-nitroanilina/ml}$	Absorbancia
0,2	4	0,342
0,3	6	0,499
0,4	8	0,619
0,5	10	0,762

Tabla IV.5. Lecturas de absorbancias obtenidas de diluciones de p-nitroanilina (λ :390)

Debido a que los valores obtenidos se encontraban por encima de las lecturas ensayadas para los quesos, y observando que la lectura de absorbancia del queso reggianito (0,290) correspondía aproximadamente a una concentración de cuatro $\mu\text{g.p-nitroanilina/ml}$, se preparó otra solución de concentración 0,6 mM

en el buffer anterior: TRIS 0,05M - NaCl 0,1M, pH 7,4.

Finalmente, para la confección de la curva de calibrado se tomaron diferentes volúmenes de la solución preparada (0,6 mM), con el buffer se llevó a un volumen final de 10 ml cada tubo y se leyeron las absorbancias a 390 nm llevando a cero con la solución buffer, cada punto se realizó por triplicado.

IV. 3. 5. b. Curva de calibrado con plasmina:

En el caso de la curva de calibrado realizada con plasmina comercial, se aplicó la misma metodología y condiciones de reacción descritas para la muestra en el punto IV.3.2, sólo que, en lugar de colocar en la microcubeta 25 μ l de muestra, se puso el mismo volumen (25 μ l) de distintas concentraciones de una solución de plasmina preparada en buffer TRIS 0.05 M - NaCl 0.1M, pH a 7.4 (ajustado con HCl) .

La unidad de actividad enzimática está definida como la cantidad de enzima que produce una variación de absorbancia de una unidad en 20 minutos a pH 7,5 y 37° C, teniendo la plasmina usada un índice de absorbancia de $E_{280}^{1\%} = 15,3$, presentando una actividad específica de 5,4 U / mg de enzima (0,24 U/mg de sólido).

Teniendo en cuenta los valores de absorbancia obtenidos para los quesos no cocidos y cocidos presentados en la tabla IV.4, como así también los valores de plasmina (μ g/g.) encontrados en otros trabajos de investigación (Rampilli, M., Raja, V., 1998), se prepararon distintas concentra-ciones de plasmina comercial hasta obtener una solución, cuya absorbancia obtenida al realizar la reacción correspondiente estaba próxima a la encontrada en el queso cocido (0,290), determinando que ésta correspondió a una concentración de 8 μ g.plasmina/ml. Se partió entonces de una solución madre de 160 μ g plasmina/ml, a partir de la cual,

con el buffer de reacción (TRIS 0.05 M - NaCl 0.1M, pH a 7.4) se realizaron cada una de las diluciones para la curva, se desarrolló la reacción para cada punto y se leyeron las absorbancias a 390 nm llevando a cero con la solución buffer, cada punto se realizó por triplicado.

IV. 3. 5. Linealidad de reacción en el tiempo:

Con la finalidad de corroborar el comportamiento lineal a lo largo del tiempo de reacción, a partir de la solución madre con la que se confeccionó la curva de calibrado con plasmina (160 µg.plasmina/ml) se preparó una solución de 9 µg.plasmina/ml, utilizando como siempre, el buffer de reacción (TRIS, pH 7,4). Se desarrolló la metodología descrita (IV.3.2), pero se leyó la absorbancia a distintos tiempos: 30, 60, 90, 120, 150, y 180 minutos.

IV. 4. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE UREA (UREA-PAGE):

A los efectos de correlacionar los resultados obtenidos analíticamente en la cuantificación de la plasmina en los quesos analizados, con la acción de esta enzima sobre las caseínas durante el proceso de maduración del queso, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de urea.

Esta electroforesis se basa en la diferente migración de las proteínas cuando son sometidas a un campo eléctrico en determinadas condiciones.

Se utilizó el residuo proteico insoluble a pH 4,6 de la muestra de queso. Esta fracción está constituida por caseína sin degradar y productos de demolición con peso molecular superior a 15-16000 Daltons, y por lo tanto requiere la presencia de urea como agente disociante para lograr una efectiva separación de dichas proteínas.

Se preparó la muestra disgregando en un mortero 10 gramos del queso con 20 ml de citrato de sodio 0.5 M. Una vez que se logró una suspensión homogénea se transfirió a un vaso de precipitado y agitando permanentemente se llevó a pH 4.6, obteniendo así el residuo insoluble, se centrifugó a 3.000 rpm. durante 10 minutos, conservando el residuo en freezer a -20° C hasta el momento del procesamiento para la electroforesis.

Al momento de realizar la electroforesis, se pesaron entre 5 y 6 mg y se disolvieron en 1 ml de buffer de muestra, mediante vórtex. De esta solución se sembraron 7 μ l. por calle. El buffer de muestra (pH 8.4) se preparó agregando urea, mercaptoetanol y azul de bromofenol para marcar el frente de corrida al buffer stacking (Tris 0.5M-HCl pH 6.8).

Conjuntamente con los residuos insolubles correspondientes a los quesos se corrió un caseinato patrón preparado en el laboratorio del PROLAIN para tener como referencia a los efectos de ubicar la posición de las distintas caseínas.

Se utilizó una cuba de electroforesis modelo Mini Protean II y la fuente de energía que suministró el voltaje constante fue la Model 1000/500 ambas de Bio-Rad Laboratories, California, Estados Unidos.

Para la corrida se utilizaron geles en placa dispuestos verticalmente, de 7 cm de largo, 8 cm de ancho y un espesor variable entre 0.5 y 1.5 mm.

Se empleó el método de Andrews de gel discontinuo (Andrews y col. 1983) con gel de poro grueso o de apilamiento en la parte superior de la placa con una concentración de acrilamida del 4%. Se modificó la concentración de acrilamida en el gel de separación del 12% original utilizada por Andrews para separar todas las proteínas de la leche, por una concentración de 7.5 % debido a que la muestra no contenía proteínas de suero.

A partir de una solución madre de acrilamida-bisacrilamida al 30.8% se preparó el gel de separación para una concentración de 7.5% agregando a la acrilamida, el buffer de separación (Tris (1M) , HCl pH 8.8, y como catalizador N, N, N', N'- tetrametilendiamina (TEMED)), la urea y el persulfato de amonio al 10% preparado al momento de uso .

El gel de stacking al 4.0%, se preparó agregando a la solución de acrilamida al 30.8% el buffer stacking (Tris base 0.5M , a pH 6.8 ajustado con HCl), el TEMED y el persulfato.

Se utilizó como buffer de electrodo o de corrida, glicina 0.192M en Tris base 0.025M, llevada a pH 8.3 con HCl concentrado. La corrida se realizó a un voltaje constante de 150 Volt, con una intensidad máxima de 45 mAmper, 6.75 Watt de potencia, determinando el final de la corrida por la llegada del frente de avance (azul de bromofenol) al final de la placa.

Finalizada la corrida se retiraron los geles para colorearlos utilizando Coomasie Blue R en presencia de etanol y ácido acético durante una hora. Posteriormente se eluyó el exceso del colorante utilizando como decolorante una solución de etanol, ácido acético y agua. Los geles se conservaron en agua destilada adicionada con unas gotas de ácido acético.

IV. 5. DENSITOMETRÍA :

Las placas de electroforesis PAGE se cuantificaron mediante un densitómetro Minidensit (SEAC®. Italia) a 632 nm, la relación entre el área bajo la curva y la concentración de la banda se consideró lineal.

IV. 6. PROCESO DE ELABORACIÓN DEL QUESO REGGIANITO ARGENTINO EN LA PLANTA PILOTO DEL PROLAIN:

Con el objeto de realizar la determinación de plasmina y plasminógeno en quesos cuya tecnología de elaboración y maduración fueran bien conocidas como así también de verificar los posibles cambios de la enzima durante la maduración, se usaron muestras de queso Reggianito elaboradas en la planta piloto del PROLAIN, de acuerdo a los detalles que se brindan a continuación.

Se partió de leche cruda a pH 6.60 +/- 0.05 y una acidez de 18 +/- 1° Dornic.

La leche se estandarizó a 2,50 % de materia grasa con el fin de encuadrarse en el porcentaje de proteínas que produzca un mínimo de 30 % de materia grasa en el extracto seco del queso según lo establece el Código Alimentario Argentino y se pasteurizó a 65° C durante 20 minutos. Luego se ajustó la temperatura de la leche a la de coagulación, para ello se la enfrió hasta 33° C, se adicionó CaCl₂ a una concentración final de 0.02 % (w/ v). Como medio para el aporte de bacterias lácticas, se utilizó suero ácido resíduo de otra elaboración (fermento natural), inoculando un volumen suficiente como para incrementar la acidez inicial de la leche en 4° Dornic .

Luego de 10 minutos, se agregó la enzima coagulante de la leche a razón de 29 ml por cada 100 litros de leche (Coagulante bovino adulto 230 IMCU/ml Naturen de Chr. Hansen, Quilmes, Argentina).

A los 18-20 minutos de producida la coagulación de la leche y cuando la cuajada adquirió la consistencia necesaria, se cortó para adecuar el tamaño del grano aproximadamente a la mitad de un grano de arroz. Posteriormente se calentó poco a poco la cuajada con agitación hasta 44° C a razón de 1° C/min., a los efectos de reducir la humedad en el grano. A continuación se calentó

rápidamente llevando la mezcla hasta 51° C, suspendiendo luego la agitación. Se separó la cuajada y se colocó en moldes descartando el suero remanente. La cuajada se prensó durante 24 horas al cabo de las cuales se llevó a salmuera al 20% (w / v), durante 6 días a 12° C, invirtiendo el queso todos los días durante este lapso.

La maduración se realizó en cámara a 12° C y 80% de humedad relativa durante seis meses.

IV. 7. DETERMINACIONES DE PH :

Para la determinación del pH de cada muestra de queso se usó un instrumento manual de Horiba (Horiba Ltd., Japón) provisto de un electrodo combinado vidrio-calomel calibrado con tampones de pH 4 y pH 7, sensibilidad de 0,01 unidades de pH y con compensador de temperatura. Con un calador se procedió a retirar un pequeño cono del queso. En el lugar que quedó en la masa del mismo se colocó una gota de agua para facilitar el contacto con el electrodo y allí se lo colocó y se realizó la determinación.

Para la determinación del pH de las soluciones buffer empleadas se utilizó un equipo con las siguientes características : pH-Meter Type E 5116, titriscop, Metrohm Herisau®, Switzerland.

IV. 8 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS :

Se efectuó un análisis descriptivo de los datos para cada muestra de queso, verificando la distribución normal de los valores.

A los valores de cada muestra de queso (cinco determinaciones), se aplicó la Prueba Q de Dixon a los efectos de detectar valores estadísticamente diferentes dentro del grupo para $p = 0,05$.

Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si dentro de un mismo tipo de quesos, ya sea no cocido, semicocido o cocido, había o no una variación significativa entre los valores de plasmína hallados para cada uno de ellos.

Para determinar si existía diferencia estadísticamente significativa en las cantidades de plasmína halladas entre los distintos tipos de quesos se volvió a aplicar, al igual que en el estudio anterior, ANOVA de una vía entre los distintos quesos : no cocidos con semicocidos, no cocidos con cocidos y los quesos semicocidos con los cocidos. Finalmente se aplicó el análisis estadístico para comparar los valores encontrados en la cuajada de un queso Reggianito Experimental (PROLAIN) con el queso al final de la maduración.

A los efectos de identificar las medias que fueron estadísticamente diferentes ya sea dentro de un mismo tipo de queso, como en la comparación entre tipos diferentes, se aplicó el test de rango múltiple para un nivel de confianza del 95%.

Se aplicaron los test de Cochran, Bartlett, y Hartley para verificar la homocedasticidad de la variancia.

En los casos que no se verificó homocedasticidad se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis.

Capítulo V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta sección del trabajo se divide en tres partes teniendo en cuenta la diversa naturaleza de los resultados obtenidos. En primer lugar se analizan los datos correspondientes a los distintos aspectos de la adaptación de la técnica colorimétrica para la evaluación de plasmina y plasminógeno. En segundo término, se presentan y discuten los resultados de la evaluación del nivel de plasmina y plasminógeno en quesos comerciales y de elaboración propia, como así también los valores de las variables fisicoquímicas de estos productos. Por último se presentan y discuten los resultados del análisis electroforético del residuo caseínico insoluble a pH 4.6 de los distintos quesos y se analiza su correlación con los niveles de plasmina y plasminógeno encontrados.

V.1. METODOLOGÍA COLORIMÉTRICA SELECCIONADA PARA LA DETERMINACIÓN DE PLASMINA Y PLASMINÓGENO EN QUESOS:

V.1.1. Verificación de la longitud de onda de trabajo:

Los resultados del espectro realizado con la solución de p-nitroanilina se presentan en Tabla V.1 y en la Fig. V.1.

Absorbancia	λ (nm)
0,354	350
0,461	360
0,570	370
0,674	375
0,765	380
0,799	385
0,825	390
0,816	395
0,806	400
0,770	405
0,728	410
0,660	420
0,429	430
0,271	450

Tabla V.1. Espectro de absorción de la p-nitroanilina

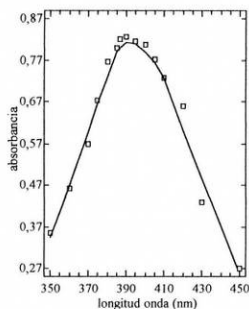


Fig.V.1. Espectro de absorción de la p-nitroanilina

Con el espectro se determinó que la máxima absorción de la solución de p-nitroanilina en las condiciones de trabajo de la experiencia se presentó a una longitud de onda de 390 nm, motivo por el cuál, a los efectos de tener la máxima sensibilidad, se adoptó la misma para efectuar todas las lecturas espectrofotométricas realizadas en la experiencia.

V. 1. 2. Curva de calibrado con la solución de p-nitroanilina en el buffer de trabajo:

En la Tabla V.2 y Fig.V.2. se presentan las absorbancias y las concentraciones para la curva de calibrado p-nitroanilina, cada punto se realizó por triplicado.

Se verificó la linealidad del método a los fines de corroborar la proporcionalidad entre la concentración y su respuesta dentro del rango de concentraciones de trabajo.

p-nitroanilina ($\mu\text{g./ml}$)	Absorbancia (media \pm DS)
0,2	0,033 \pm 0,003
0,4	0,053 \pm 0,006
0,8	0,078 \pm 0,003
1,6	0,143 \pm 0,006
2	0,170 \pm 0,000
2,4	0,203 \pm 0,005
2,8	0,232 \pm 0,003
3,6	0,297 \pm 0,006
4	0,323 \pm 0,005
4,8	0,383 \pm 0,005
5,5	0,437 \pm 0,003

Tabla V.2. Valores de curva de calibrado con p-nitroanilina (determinaciones por triplicado).

Se determinó la curva de regresión por el método de los cuadrados mínimos. Según este análisis el resultado se ajusta a un modelo lineal para describir la relación entre la absorbancia y la concentración ($\mu\text{g.p-nitroanilina/ml}$). La ecuación que se ajusta al modelo es entonces:

$$\text{Abs.} = 0.0201 + 0.0759 \times [\mu\text{g.p-nitroanilina/ml}] \quad (\text{Ecuación 1})$$

El análisis de la variancia (ANOVA) indica una relación estadísticamente significativa ($p < 0,01$) entre la absorbancia y la concentración de p-nitroanilina con un nivel de confianza del 99%, existiendo una fuerte relación lineal entre las variables teniendo un coeficiente de correlación $r = 0,999$. El límite de detección (LD) fue de $0,054 \mu\text{g.p-nitroanilina/ml}$ y el de cuantificación (LC) de $0,180 \mu\text{g.p-nitroanilina/ml}$.

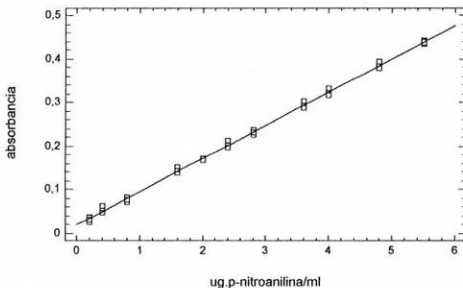


Fig. V.2. Curva de calibrado p-nitroanilina .

V. 1. 3. Curva de calibrado con la solución de plasmina en el buffer de trabajo:

En la Tabla V.3 y Fig.V.3. se presentan las absorbancias y las concentraciones para la curva de calibrado con plasmina, cada punto se realizó por triplicado.

$\mu\text{g. plasmina/ml}$	Absorbancia (Media +/- DS)
0,7	0,033 +/- 0,005
1,1	0,074 +/- 0,008
1,6	0,085 +/- 0,006
5,3	0,192 +/- 0,003
8,0	0,284 +/- 0,006
16	0,609 +/- 0,007
19	0,688 +/- 0,007

Tabla V.3. Valores de curva de calibrado con plasmina (determinaciones por triplicado) .

Con la misma metodología utilizada para la curva de calibrado con p-nitroanilina, se determinó la curva de regresión, ajustándose los resultados a un modelo lineal para describir la relación entre la absorbancia y la concentración ($\mu\text{g. plasmina/ml}$). La ecuación que se ajusta al modelo es entonces :

$$\text{Abs.} = 0.0173 + 0.0355 \times [\mu\text{g. plasmina/ml}] \quad (\text{Ecuación 2})$$

También en esta curva, el análisis de la variancia (ANOVA) indicó una relación estadísticamente significativa ($p < 0,01$) entre la absorbancia y la concentración de plasmina con un nivel de confianza del 99%, con un coeficiente de correlación $r = 0,994$. El límite de detección (LD) fue de $0,44 \mu\text{g. plasmina/ml}$ y el de cuantificación (LC) de $1,48 \mu\text{g. plasmina/ml}$.

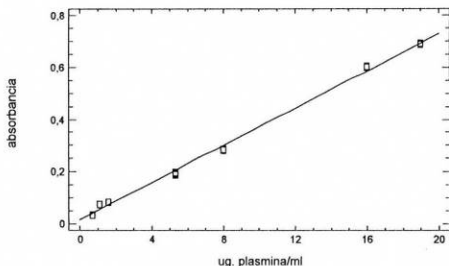


Fig. V.3. Curva de calibrado con plasmina .

V.1.4. Linealidad de la reacción en el tiempo:

Los resultados del estudio de la linealidad de la reacción a lo largo del tiempo se presentan en la Tabla V.4 y Fig. V.4..

ug. plasmina / ml	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	150 min.	180 min.
9	0,136	0,171	0,207	0,240	0,277	0,313

Tabla V.4. Absorbancias (D.O.) de una solución de plasmina (9 μg .plasmina/ml) a diferentes tiempos de reacción.

Coincidentemente con lo informado por diversos autores se corroboró un comportamiento lineal hasta las tres horas (r : 0,99, nivel confianza 95%) para ambas concentraciones de plasmina. Se decidió tomar como tiempo de reacción 180 minutos ya que se tuvo en cuenta lo informado por P. Ollikainen y K. Nyberg (1.988), quienes observaron que la sensibilidad del método original de Rollema se incrementó usando hasta 6 horas de incubación, indicando que también se podrían utilizar 10-15 minutos de incubación pero la sensibilidad del método resulta pobre.

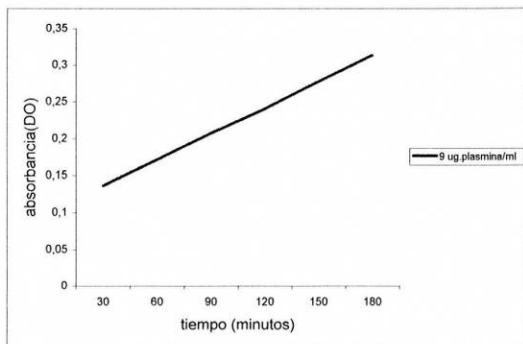


Fig.V. 4. Curva de absorbancia de una solución de plasmina (9 μg plasmina/ml) a diferentes tiempos de reacción.

V. 2. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS EN QUESOS:

Con la metodología descrita en el punto IV.3.4 del capítulo de Material y Métodos se procesaron las muestras distribuidas entre quesos comerciales no cocidos, semicocidos y cocidos, y los Reggianitos Experimentales de la Planta Piloto del PROLAIN, tal como se detalló en el punto IV.2 del mismo capítulo.

Los resultados se presentan en las tablas siguientes expresando los mismos como μg .plasmina/g.queso y mg.p-nitroanilina/g.queso, también se presentan las gráficas correspondientes para la expresión de resultados como μg .plasmina / gramo de queso.

En el Anexo III se presentan los parámetros estadísticos de los resultados así como las gráficas expresando los resultados como mg p-nitroanilina/g. queso.

V. 2. 1. Actividad de Plasmina en quesos comerciales argentinos:

V. 2. 1. a. Quesos no cocidos:

En la tabla V.5 se presentan los valores medios y desviación estándar de la actividad de plasmina obtenida en los quesos comerciales no cocidos ($n=5$) y en la figura V.5. se grafican estos valores y el cuadrado mínimo de las desviaciones estándar (LSD) para un 95% de nivel de confianza.

En el Anexo III.1 se presentan los estadísticos de estos quesos.

Muestra ($n=5$)		mg.p-nitroanilina/g. queso	$\mu\text{g. plasmina/g. queso}$
Quesos No Cocidos	Blanco 1 (NC-B ₁)	0,053+/-0,009	4,99+/- 0,80
	Blanco 2 (NC-B ₂)	0,051+/-0,0072	4,78+/- 0,63
	Magro (NC-Ma)	0,060+/-0,0087	5,56+/- 0,77
	Cremoso (NC-Cr)	0,062+/-0,0180	5,77+/- 1,61

Tabla V.5. Valores de plasmina obtenidos en quesos comerciales no cocidos (Valor medio+/-DS)

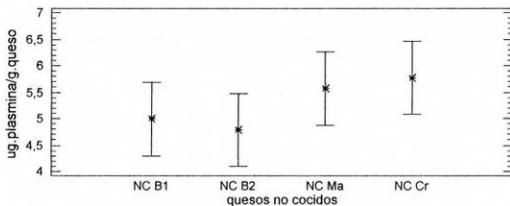


Fig. V.5. Valores de plasmina ($\mu\text{g plasmina/gr. queso}$) obtenidos en quesos comerciales no cocidos (Valor medio+/-LDS, 95%).

Se verificó una distribución normal de los datos y para cada muestra de queso ($n=5$) se aplicó la Prueba Q de Dixon a los efectos de detectar valores estadísticamente diferentes dentro del grupo para $p = 0,05$, no se verificó en ningún caso valores anómalos.

Bajo ambas formas de expresar los resultados (mg.p-nitroanilina ó

$\mu\text{g. plasmina} / \text{g. queso}$) el valor de p en el test-F fue mayor a 0.05 lo que implica que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias con un 95% de nivel de confianza.

V. 2. 1. b. Quesos semicocidos:

En la tabla V.6 se presentan los valores medios y desviación estándar de la actividad de plasmina obtenida en los quesos comerciales semicocidos ($n=5$) y en la figura V.6. se grafican estos valores y el cuadrado mínimo de las desviaciones estándar (LSD) para un 95% de nivel de confianza.

En el Anexo III.2 se presentan los estadísticos de estos quesos.

Muestra (n=5)		mg p-nitroanilina/g. queso	$\mu\text{g. plasmina/g. queso}$
Quesos Semicocidos	Gouda (SC-Go)	0,138 \pm 0,0088	12,55 \pm 0,78
	Holanda (SC-Ho)	0,136 \pm 0,0060	12,34 \pm 0,54
	Port Salut 1 (SC-PS ₁)	0,131 \pm 0,0104	11,87 \pm 0,93
	Port Salut 2 (SC-PS ₂)	0,140 \pm 0,0157	12,70 \pm 1,39
	Provolone(SC-Pr)	0,079 \pm 0,0063	7,26 \pm 1,74
	Pategras (SC-Pa)	0,145 \pm 0,0197	13,13 \pm 0,53

Tabla V.6. Valores de plasmina obtenidos en quesos comerciales semicocidos. (Valor medio \pm DS)

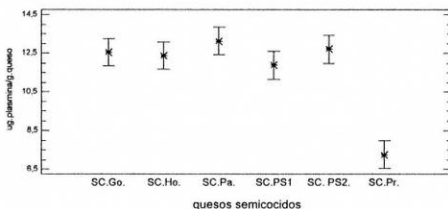


Fig. V.6. Valores de plasmina obtenida en quesos semicocidos ($\mu\text{g plasmina/g. queso}$). (Valor medio \pm LDS, 95%)

Se verificó una distribución normal de los datos y para cada muestra de queso ($n=5$) se aplicó la Prueba Q de Dixon a los efectos de detectar valores estadísticamente diferentes dentro del grupo para $p = 0,05$, no se verificó en ningún caso valores anómalos.

Bajo ambas formas de expresar los resultados (mg p-nitroanilina ó $\mu\text{g. plasmina / g. queso}$) el valor de p en el test-F es menor a 0.05 esto implica que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias para un 95% de nivel de confianza. Aplicando el test de Rango Múltiple se observa que la media que es estadísticamente diferente a las demás corresponde al queso Provolone, con un valor de plasmina menor al resto de los quesos semicocidos.

V. 2. 1. c. Quesos cocidos :

En la tabla V.7 se presentan los valores medios y desviación estándar de la actividad de plasmina obtenida en los quesos comerciales y experimentales cocidos ($n=5$) y en la figura V.7. se grafican estos valores y el cuadrado mínimo de las desviaciones estándar (LSD) para un 95% de nivel de confianza.

En el Anexo III.3 se presentan los estadísticos de estos quesos.

Muestra (n=5)		mg p-nitroanilina/g. queso	$\mu\text{g. plasmina/g. queso}$
Quesos Cocidos	Parmesano (C-Pa)	0,220 \pm 0,017	19,86 \pm 0,92
	Reggianito 1 (C-R ₁)	0,235 \pm 0,010	21,18 \pm 1,51
	Reggianito 2(C-R ₂)	0,156 \pm 0,0080	14,11 \pm 0,71
	Reggianito 3 (C-R ₃)	0,121 \pm 0,021	11,06 \pm 1,26
	Reggianitos PROLAIN (C-REx)	0,161 \pm 0,014	14,57 \pm 1,91

Tabla V.7. Valores de plasmina obtenidos en quesos comerciales y experimentales cocidos. (Valor medio \pm DS)

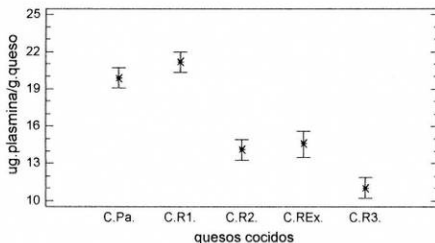


Fig.V.7. Valores medios de plasmina obtenida en quesos cocidos (μg plasmina/gr. queso). (Valor medio \pm LDS, 95%)

Se verificó una distribución normal de los datos y para cada muestra de queso ($n=5$) se aplicó la Prueba Q de Dixon a los efectos de detectar valores estadísticamente diferentes dentro del grupo para $p = 0,05$, no se verificó en ningún caso valores anómalos.

Bajo ambas formas de expresar los resultados (mg p-nitroanilina ó μg .plasmina / g. queso), el valor de p en el test-F es menor a 0.05 implica que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias con un 95% de nivel de confianza. Aplicando el test de Rango Múltiple se observa que las medias estadísticamente diferentes se agrupan en tres: en el primer grupo se halla el Reggianito 3, en el segundo grupo el Reggianito 2 y el Reggianito Experimental PROLAIN, y en el tercer grupo el Parmesano y el Reggianito 1. Estos grupos ordenados en forma creciente en cuanto al contenido de plasmina hallado.

V. 2. 2. Actividad de Plasmina en quesos Reggianitos Experimentales (180 días de maduración) elaborados en el PROLAIN :

Se cuantificó la plasmina en quesos Reggianitos elaborados en la Planta Piloto del PROLAIN, se procesaron tres quesos elaborados en distintas jornadas

realizando las determinaciones por quintuplicado en cada caso, todos los quesos tuvieron 180 días de maduración.

En la tabla V.8 se presentan los valores medios y desviación estándar de la actividad de plasmina de estos quesos experimentales cocidos ($n=5$) y en la figura V.8. se grafican estos valores y el cuadrado mínimo de las desviaciones estándar (LSD) para un 95% de nivel de confianza.

En el Anexo III.4 se presentan los estadísticos de estos quesos.

Muestra (n=5)		mg p-nitroanilina/g. queso	$\mu\text{g. plasmina/g. queso}$
Queso Reggiano Experimental	1	0,178 \pm 0,0120	16,07 \pm 1,07
	2	0,168 \pm 0,0090	15,22 \pm 0,80
	3	0,137 \pm 0,0038	12,41 \pm 0,35

Tabla V. 8. Valores de plasmina obtenidos en quesos Reg Experimentales (180 días) . (Valor medio \pm DS).

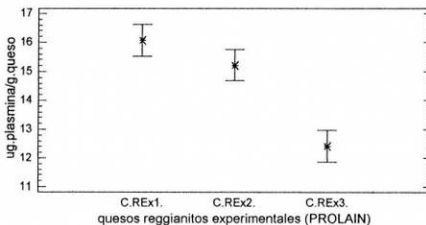


Fig. V.8. Valores medios de plasmina obtenida en quesos Reggianos Experimentales (180 días). (Valor medio \pm LSD, 95%).

Se verificó una distribución normal de los datos y para la cada muestra de queso ($n=5$) se aplicó la Prueba Q de Dixon a los efectos de detectar valores estadísticamente diferentes dentro del grupo para $p = 0,05$, no se verificó en ningún caso valores anómalos.

Bajo ambas formas de expresar los resultados (mg p-nitroanilina ó $\mu\text{g. plasmina} / \text{g. queso}$), el valor de p en el test-F es menor a 0.05 implica que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias con un 95% de nivel de confianza. Aplicando el test de Rango Múltiple se observa que las medias de los quesos Reggianitos Experimentales 1 y 2 se diferencian estadísticamente de la media del Reggianito Experimental 3, siendo ésta menor a las anteriores en cuanto al valor de plasmina observado.

V. 2.3. Representación gráfica de la actividad de plasmina en distintos tipos de quesos:

En la figura V.9 se presentan gráficamente con fines comparativos los contenidos de plasmina promedio ($n=5$) determinados en los diversos tipos de quesos comerciales y en los experimentales.

Se observa el aumento de la actividad de plasmina :

no cocidos < semicocidos < cocidos

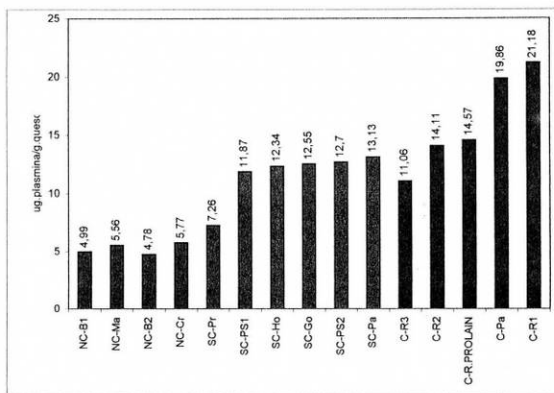


Fig. V.9. Actividad de plasmina ($\mu\text{g plasmina/g queso}$) en distintos quesos comerciales y en queso Reggiano PROLAIN. (Valores medios $n=5$). ■ No Cocidos ■ Semicocidos ■ Cocidos

V. 2. 4. Relación plasminógeno : plasmina en quesos comerciales :

En las tablas V.9 y V.10 se presentan los valores medios y las desviaciones estándar de la relación plasminógeno:plasmina para quesos no cocidos ($n=5$), semicocidos ($n=7$) y cocidos ($n=7$) y en las figuras V.10. y V.11. se grafican estos valores y el cuadrado mínimo de las desviaciones estándar (LSD) para un 95% de nivel de confianza.

En el Anexo III.5 se presentan los estadísticos de estos quesos.

	Plasminógeno mg p-nitroanilina/ g	Plasmina mg p-nitroanilina / g	Relación plasminogeno/plasmina
No Cocidos ($n=5$)	0,071 \pm 0,016	0,054 \pm 0,012	1,38 \pm 0,43
Semi-Cocidos ($n=7$)	0,175 \pm 0,054	0,135 \pm 0,017	1,28 \pm 0,28
Cocidos ($n=7$)	0,119 \pm 0,041	0,194 \pm 0,053	0,61 \pm 0,12

Tabla V.9. Relación plasminógeno : plasmina (mg p-nitroanilina / g.) obtenido en los quesos. (Valor medio \pm DS)

Tipo de Queso	Plasminógeno $\mu\text{g} \cdot \text{plasmina/g}$.	Plasmina $\mu\text{g} \cdot \text{plasmina} / \text{g}$.	Relación plasminogeno/plasmina
No Cocidos (n=5)	6,342 \pm 1,40	5,04 \pm 1,09	1,31 \pm 0,39
Semi-Cocidos (n=7)	15,63 \pm 4,85	12,30 \pm 1,56	1,26 \pm 0,28
Cocidos (n=7)	10,65 \pm 3,69	17,57 \pm 4,70	0,60 \pm 0,12

Tabla V.10. Relación plasminógeno : plasmina ($\mu\text{g} \cdot \text{plasmina} / \text{g}$.) obtenido en los quesos. (Valor medio \pm DS)

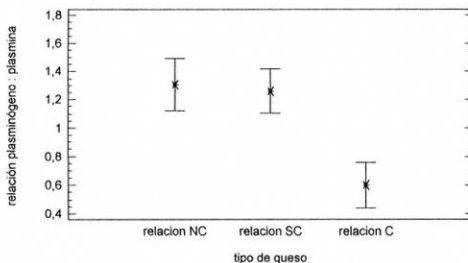


Fig. V.10. Relación plasminógeno : plasmina ($\mu\text{g} \cdot \text{plasmina/g}$.) para los distintos tipos de quesos. (Valor medio \pm LDS, 95%).

Se verificó una distribución normal de los datos y para la cada muestra de queso (n=5) se aplicó la Prueba Q de Dixon a los efectos de detectar valores estadísticamente diferentes dentro del grupo para $p = 0,05$, no se verificó en ningún caso valores anómalos.

El valor de p en el test-F es menor a 0.05 implica que hay una diferencia estadísticamente significativa en la relación plasminógeno:plasmina entre los quesos No Cocidos, Semicocidos y Cocidos, con un 95% de nivel de confianza, teniendo el valor de la relación un orden decreciente respectivamente.

Aplicando el test de Rango Múltiple se observa que las medias de las relaciones plasminógeno: plasmina de los quesos no cocidos y los semicocidos no se diferencian significativamente entre sí, pero la relación para estos dos tipos es significativamente diferente a la de los quesos cocidos.

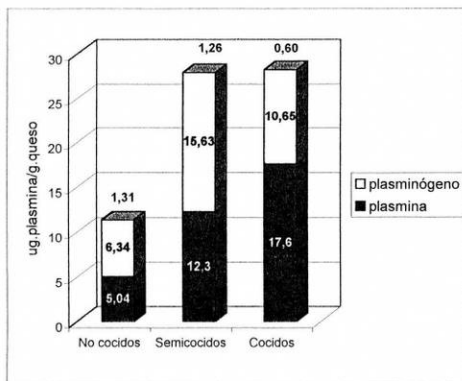


Fig.V.11. Plasmina y plasminógeno en quesos comerciales argentinos (μg plasmina/g). Valor sobre la barra indica relación Plasminógeno:Plasmina.

V. 2. 5. Variación de la actividad de Plasmina y Plasminógeno entre la cuajada y el queso al final de su maduración (180 días) para el Reggianito Experimental del PROLAIN :

Se hicieron cinco determinaciones en la cuajada con la que se elaboró un queso reggianito en la planta piloto del PROLAIN, cuantificando la plasmina y el

plasminógeno. Las mismas determinaciones se realizaron en el queso a seis meses de maduración. Como se describió en el punto IV. 3. 4., la muestra de cuajada se preparó de igual forma a las muestras de queso.

En la tabla V.11 y 12 se presentan los valores medios y las desviaciones estándar expresados como mg nitroanilina/g.queso y μg .plasmina/g.queso respectivamente para una cuajada ($n=5$), y Reggiano Experimental (180 días maduración) ($n=5$) y en las figuras V.12. y V.13. se grafican estos valores y el cuadrado mínimo de las desviaciones estándar (LSD) para un 95% de nivel de confianza.

En el Anexo III.6 se presentan los estadísticos de estos valores.

Cuajada ó Queso ($n=5$)	Plasmina mg.p-nitroanilina /g	Plasminógeno mg.p-nitroanilina /g	Relación Plasminógeno/plasmina
Cuajada	0,077+/-0,0078	0,234+/-0,0029	3,06+/- 0,29
Reg.Experimental (180 días)	0,178+/-0,012	0,124+/-0,0034	0,70+/- 0,1

Tabla V.11. Valores de plasmina y plasminógeno en Cuajada y queso Reggiano Experimental (180 días) (mg p-nitroanilina/g) (Valor medio+/-DS).

Cuajada ó Queso ($n=5$)	Plasmina μg .plasmina/g	Plasminógeno μg .plasmina /g	Relación Plasminógeno/ plasmina
Cuajada	7,09+/- 0,68	20,9+/- 0,29	2,96+/-0,27
Reg.Experimental (180 días)	16,07+/- 1,06	11,1+/-0,29	0,69+/-0,1

Tabla V.12. Plasmina y plasminógeno en cuajada y queso reggiano experimental (μg .plasmina/g) . (Valor medio+/-DS).

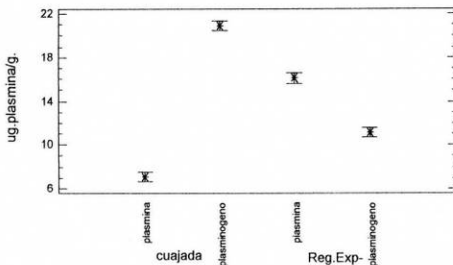


Fig. V.12. Plasmina y plasminógeno en cuajada y queso reggianito experimental (180 días) ($\mu\text{g. plasmina/g.}$). (Valor medio \pm LDS, 95%).

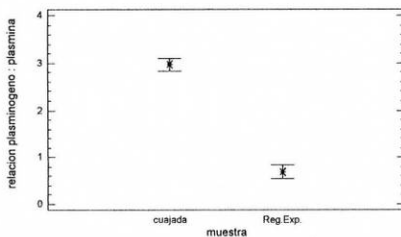


Fig. V.13. Relación plasminógeno : plasmina en cuajada y queso reggianito experimental (180 días) ($\mu\text{g. plasmina/g.}$). (Valor medio \pm LDS, 95%)

Se verificó una distribución normal de los datos y para la muestra de cuajada y la de queso ($n=5$) se aplicó la Prueba Q de Dixon a los efectos de detectar valores estadísticamente diferentes dentro del grupo para $p = 0,05$, no se verificó en ningún caso valores anómalos.

El valor de p en el test-F es menor a 0.05 implica que hay una diferencia estadísticamente significativa en la actividad de plasmina y plasminógeno encontrados en la cuajada y el queso Regianito Experimental proveniente de

dicha cuajada, al igual que en la relación plasminógeno: plasmina de los mismos, con un 95% de nivel de confianza.

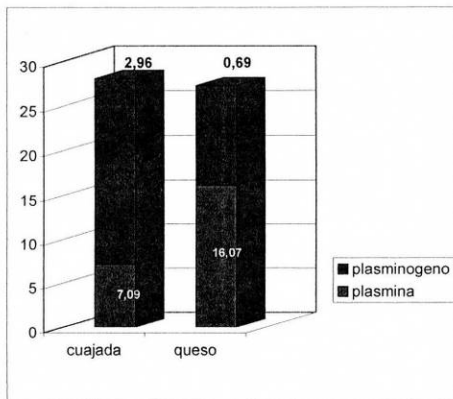


Fig. V.14. Plasmina y plasminógeno en cuajada y queso Reggianito Experimental (180 días) ($\mu\text{g. plasmina/g}$). Valor sobre la barra indica relación Plasminógeno:Plasmina.

V. 2. 6. Determinación del pH en los distintos tipos de quesos :

Se determinó el pH a los distintos tipos de quesos procesados a los efectos de poder analizar la posibilidad de una incidencia de la mayor o menor acidez de los mismos con la actividad de plasmina encontrada en cada queso. En la tabla V.13 se presentan los valores de pH medidos y en la Fig. V.15 se grafica el valor medio de los pH para cada tipo de queso (no cocidos, semicocidos y cocidos) el cuadrado mínimo de las desviaciones estándar (LSD) para un 95% de nivel de confianza.

En el Anexo III.7 se presentan los estadísticos de estos valores.

No Cocidos	pH	Semicocidos	pH	Cocidos	pH
Cremoso	5,2	Gouda	5,38	Parmesano	5,45
Blanco 1	4,74	Holanda	5,51	Reg. 1	5,39
Blanco 2	4,59	Pategras	5,6	Reg. 2	5,34
Magro	5,60	Port Salut 1	5,23	Reg. 3	5,34
		Port Salut 2	5,26	Reg. Experimentales	5,18
		Provolone	5,26		
Media	5,03+/- 0,45		5,36+/- 0,16		5,34+/- 0,1

Tabla V.13. Valores de pH medidos en los distintos tipos de quesos

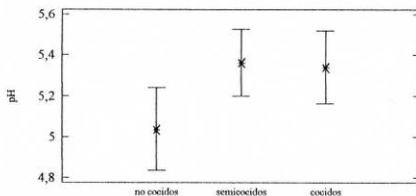


Fig.V. 15. pH medidos en los distintos tipos de quesos. (Valor medio+/-LDS, 95%)

En el análisis estadístico de los pH encontrados en los quesos no cocidos, semicocidos, y cocidos, el valor de p en el test-F fue mayor a 0.05 lo que implica que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias con un 95% de nivel de confianza.

V. 2. 7. Análisis estadístico de los valores obtenidos :

Se aplicaron las pruebas estadísticas y test descriptos en el punto IV.8 del capítulo de Material y Métodos .

En el Anexo III.8, se presentan los datos estadísticos de estos análisis comparativos tanto para los resultados expresados en mg p-nitroanilina/g.queso como en μg . plasmina/g. queso.

V.2.7.a. Comparación estadística entre quesos no cocidos y semicocidos :

En la Fig.V.16 se presentan las medias y cuadrado mínimo de las desviaciones estándar (LSD) para cada uno de los quesos no cocidos y semicocidos, mientras que en la Fig.V.17 se grafica la media general y LSD de todos los quesos no cocidos y la media general y LSD de todos los quesos semicocidos, y en la tabla V.14 se presentan los valores de la figura 17.

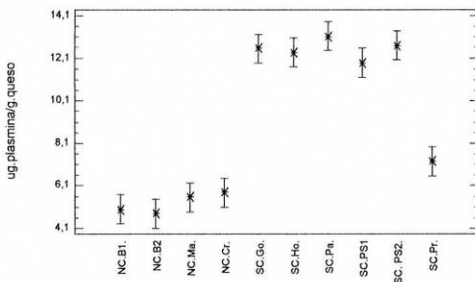


Fig.V.16. Medias individuales de plasmina en quesos No Cocidos y Semicocidos (μg .plasmina / g.queso)(Valores medios \pm LSD).

Tipo de queso	μg .plasmina/g.queso
No Cocidos (n=20)	5,28 \pm 1,03
Semicocidos (n=30)	11,65 \pm 2,26

Tabla V.14. Media general en quesos No Cocidos y Semicocidos (μg .plasmina/g.queso)

(Media \pm DS).

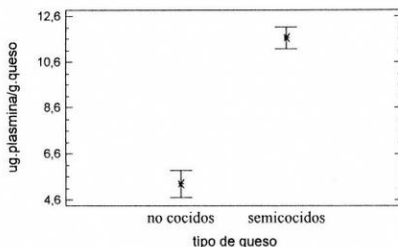


Fig. V-17 Medias generales de plasmína en quesos No Cocidos y Semicocidos (μg plasmína/gr. queso)

El valor de p en el test-F es menor a 0.05 implica que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los quesos no cocidos y semicocidos con un 95% de nivel de confianza, siendo menor los valores de plasmína en los no cocidos respecto a los semicocidos.

V.2.7.b. Comparación estadística entre quesos no cocidos y cocidos :

En la Fig.V.18 se presentan las medias y cuadrado mínimo de las desviaciones estándar (LSD) para cada uno de los quesos no cocidos y cocidos, mientras que en la Fig.V.19 se grafica la media general y LSD de todos los quesos no cocidos y de todos los quesos cocidos, y en la tabla V.15 los valores de la figura 19.

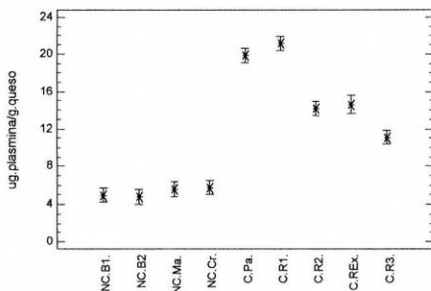


Fig.V.18. Medias individuales de plasmina en quesos No Cocidos y Cocidos ($\mu\text{g.plasmina} / \text{g.queso}$). (Media+/-LSD)

Tipo de queso	$\mu\text{g.plasmina/g.queso}$
No Cocidos (n=20)	5,28+/-1,03
Cocidos (n=35)	15,7+/-3,60

Tabla V.15. Media general en quesos No Cocidos y Cocidos ($\mu\text{g.plasmina/g.queso}$) (Media+/-DS).

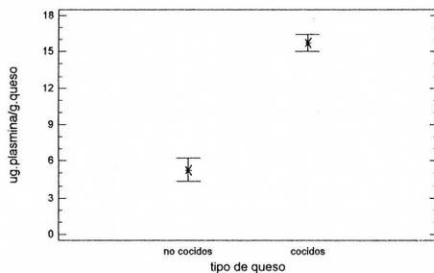


Fig.V.19. Medias generales de plasmina en quesos No Cocidos y Cocidos ($\mu\text{g.plasmina} / \text{g.queso}$) (Media+/-LSD).

El valor de p en el test-F es menor a 0.05 implica que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los quesos no cocidos y cocidos con un 95% de nivel de confianza, siendo menor los valores de plasmina en los no cocidos respecto a los cocidos.

V.2.7.c. Comparación estadística entre quesos Semicocidos y Cocidos :

En la Fig.V.20 se presentan las medias y cuadrado mínimo de las desviaciones estándar (LSD) para cada uno de los quesos semicocidos y cocidos, mientras que en la Fig.V.21 se grafica la media general y LSD de todos los quesos semicocidos y de todos los quesos cocidos, y en la tabla V.16 los valores de la figura 21.

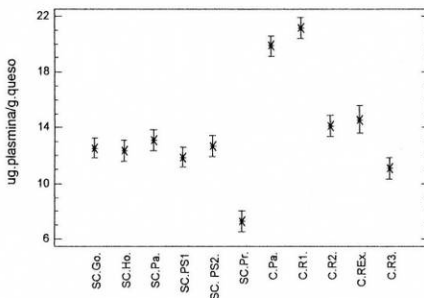


Fig.V.20. Medias individuales de plasmina en quesos Semicocidos y Cocidos ($\mu\text{g.plasmina} / \text{g.queso}$)(medio \pm LSD).

Tipo de queso	$\mu\text{g.plasmina/g.queso}$
Semicocidos (n=30)	11,65 \pm -2,26
Cocidos (n=35)	15,70 \pm -3,60

Tabla V.16. Media general en quesos Semicocidos y Cocidos ($\mu\text{g.plasmina/g.queso}$) (Media \pm -

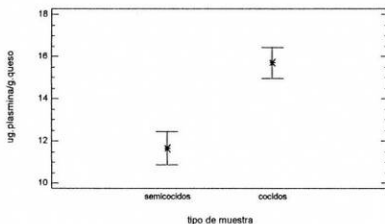


Fig. V-21. Medias generales de plasmina en quesos Semicocidos y Cocidos (μg plasmina/gr. queso)(Media \pm LSD)

El valor de p en el test-F es menor a 0.05 implica que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los quesos semicocidos y cocidos con un 95% de nivel de confianza, siendo menor los valores de plasmina en los semicocidos respecto a los cocidos.

V. 3. DISCUSIÓN :

V.3. 1. Actividad de plasmina y plasminógeno en quesos argentinos:

La mayor parte de la plasmina y plasminógeno de la leche son retenidos en la cuajada durante la elaboración del queso. Sin embargo el 80% del total de actividad de plasmina en la leche se encuentra inactiva como plasminógeno. Las variaciones en la actividad entre los diferentes tipos de quesos dependen por un lado, de la extensión de la activación del plasminógeno por activadores presentes en la leche (Korycka-Dahl y col., 1983; Lawrence y col. 1987; Collin, J.C. y col., 1.988; Farkye y Fox,1990). Por otra parte, la concentración y actividad de plasmina y plasminógeno en quesos es dependiente de la tecnología usada en la

elaboración de los mismos, así como de otros factores de carácter no tecnológicos, tales como la etapa de la lactancia, o la raza y la edad de la vaca por ejemplo, que determinan la variación de actividad de esta enzima en la leche (Grufferty, M.B., Fox, P.F., 1988).

En cuanto a los factores no tecnológicos que afectan el contenido de plasmina en la leche, los mismos se desarrollaron en el Capítulo II. La incidencia de estos factores en los niveles de plasmina puede constituir una línea para la continuación de la investigación.

Dentro de los factores tecnológicos, se pueden citar tres como de suma relevancia en cuanto a su impacto en el contenido de plasmina-plasminógeno en los quesos: el tipo de coagulación que se realiza (proporción de coagulación ácida y enzimática efectuada), el proceso de cocción, y el tiempo de maduración del queso.

En el presente trabajo se determinó la actividad de plasmina y plasminógeno en distintos tipos de quesos comerciales no cocidos, semicocidos y cocidos; así como en quesos reggianitos experimentales y su cuajada.

Dentro del grupo de los **quesos no cocidos analizados** : dos quesos Blancos de distinta marca (NC-B₁, NC-B₂), queso Magro Natural Untable (NC-Ma), y queso Cremoso (NC-Cr), no presentaron diferencia estadísticamente significativa entre las medias del contenido de plasmina para un nivel de confianza del 95%. Esto se justifica por el hecho de que, en términos generales, la metodología del proceso de elaboración es parecida, ya que se trata de quesos de pasta no cocida y blanda, cuya coagulación se produce por cuajo a veces complementada por acidificación láctica y/o enzimas específicas.. Se trata de quesos ligeramente ácidos y sin maduración como en el caso de los quesos Blancos o, como en el queso Cremoso con un período de maduración muy corto

(menor a 30 días). El pH relativamente bajo de estos quesos, la ausencia de cocción y el corto período de maduración, determina una actividad muy limitada de la plasmina en los mismos. El pH medido en los quesos no cocidos procesados en nuestra experiencia tuvo una media de 5,03± 0,5, encontrando los valores más bajos en los quesos blancos con un valor de 4,5 coincidiendo esto con el valor más bajo de plasmina encontrado en los quesos analizados.

En los quesos donde se logra la coagulación de la leche mediante el agregado de ácidos (coagulación ácida), con o sin el agregado de pequeñas cantidades de coagulantes de leche, la plasmina y el plasminógeno son disociados en forma importante de la micela de caseína y se eliminan con el suero, no ocurriendo lo mismo en la coagulación enzimática (Grufferty, M.B., Fox, P.F., 1988; Dupont, D., Grappin, R., 1.998) . Crudden y Kelly (2.003) demostraron que en un suero obtenido de la acidificación de leche pasteurizada descremada con glucano δ - lactona hasta pH 4,6, la actividad de plasmina fue mucho mayor que en la leche original, probando así la disociación de la enzima de la micela de caseína a pH bajos.

En el caso de los quesos blandos en general, la tecnología de elaboración de los mismos, tiene una destacada importancia en el complejo plasmina-plasminógeno.

Efectivamente, en este tipo de quesos la etapa de acidificación en la cuajada se produce en pocas horas (2-3 hs.) hasta un pH próximo a 5,1 después del moldeo. Esta acidificación entonces, se realiza al mismo tiempo que el desuere, lo que haría que el plasminógeno y la plasmina se pierdan con el suero ya que sus uniones a la caseína se encuentran debilitadas por el bajo pH. Estas condiciones determinan que la plasmina total (plasmina+plasminógeno) encontrada en los quesos blandos haya resultado menor a la encontrada en los

quesos semiduros y duros. En los quesos duros la acidificación hasta pH 5,2 se produce en unas 48 horas (prensado+oreo), sobre una cuajada ya seca, es decir, el desuerado se produjo previamente en la tina, antes de la acidificación. Por este motivo, la plasmina y el plasminógeno no se pierden de la cuajada quedando contenida en la misma, y por consiguiente en el queso.

Por otro lado, se encontró que la relación plasminógeno : plasmina es de 1,31 +/-0,39 para los quesos no cocidos lo que no los diferencia de la relación encontrada en los quesos semicocidos, pero sí de la relación hallada en los cocidos.

Por tratarse de quesos no cocidos o elaborados con tratamiento de cuajada a muy baja temperatura no se produce la inactivación de los inhibidores de los activadores del plasminógeno motivo por el cual predomina la forma inactiva de la enzima (plasminógeno).

Lo observado en los quesos comerciales argentinos coincide con lo informado por D.Dupont y R. Grappin en 1.998 , quienes encontraron las más bajas concentraciones o ausencia de plasmina en los quesos frescos (pH 4,3- 4,5 en el escurrimiento) aduciendo esto al descenso del pH durante la manufactura del queso.

Del mismo modo , M. Rampilli y V. Raja en el mismo año, encontraron que en los quesos cuya tecnología no incluía la cocción presentaron la menor actividad de plasmina en relación a los semicocidos y cocidos, reconocieron como una condición relevante en la actividad de todo el sistema enzimático, la acidez del queso. Así en los quesos de pH muy bajo como en el caso del cuartirolo (pH 4,8) la actividad fue prácticamente nula, encontrando valores superiores en los quesos de pasta no cocida pero con menor acidez como en el caso de los quesos Gorgonzola y Taleggio.

Rampilli, informó una relación de plasminógeno:plasmina para quesos no cocidos (valor medio) de $2 \pm 0,60$.

Con respecto a los **quesos de masa semicocida**, al realizar el estudio estadístico de comparación de las medias de la plasmina cuantificada, se obtiene que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los quesos Gouda (SC-Go), Holanda (SC-Ho), Por Salut marca 1 (SC-PS₁), Por Salut marca 2 (SC-PS₂), Pategras (SC-Pa), mientras que sí se presentan diferencias significativas entre todos éstos y el Provolone (SC-Pr) para el mismo nivel de confianza (95%), siendo menor la actividad de plasmina encontrada en éste último .

A excepción del provolone, todos estos quesos tienen un proceso de elaboración similar utilizando fermentos constituidos por cultivos de bacterias lácticas, por cuajo y/o otras enzimas, son de pasta semidura, semicocida y tienen un período de maduración no menor al mes y medio o dos meses.

El Provolone Hilado, tiene un período de maduración de entre 3 y 8 meses, pasta semicocida, pero es hilada, para lo cual en el proceso de elaboración la masa caseosa se amasa con agua caliente (90°C) hasta conseguir el hilado a pH bajo (5,0-5,1). En este proceso "de lavado lento a pH ácido" se produce la eliminación parcial de plasmina con el agua de lavado debido a que a este pH la asociación de la plasmina con la micela estaría más debilitada. Este hecho justificaría el menor contenido de la enzima en este queso, que lo hace estadísticamente diferente a los valores medios encontrados en los otros quesos semicocidos procesados.

Coincidentemente Rampilli (1.998), informó que la plasmina total en el queso provolone fue sustancialmente menor al resto de los quesos semicocidos que investigó.

El nivel de plasmina cuantificado en los quesos semicocidos fue mayor al

encontrado en los no cocidos, presentando entre sí una diferencia estadísticamente significativa (95%), aún entre el provolone y el queso cremoso que fue el que tuvo el nivel más alto de la enzima entre los quesos no cocidos. También presentaron diferencias significativas con los quesos cocidos, y en contraste con estos quesos, los semicocidos presentaron una menor actividad de la enzima.

La mayor actividad de plasmina con relación a los quesos no cocidos se podría explicar porque en el proceso de elaboración se produce una cocción de la cuajada a una temperatura suficiente para permitir cierta inactivación térmica de los inhibidores de los activadores del plasminógeno. Conjuntamente tienen un período de maduración mayor a los quesos frescos, tiempo que permite la conversión del plasminógeno a plasmina debido a la acción de los activadores del plasminógeno (Dupont, D., Grappin, R, 1.998). Por otro lado, pH medido en estos quesos varía entre 5,23 en los quesos Por Salud y 5,60 en el Pategrás, no son tan ácidos como los frescos, favoreciendo esto la actividad proteolítica residual de la plasmina en estos quesos semicocidos.

Si bien presentaron este tipo de quesos niveles de plasmina mayores a los hallados en los no cocidos, las temperaturas de cocción no son lo suficientemente altas (40°-45°C) como para llegar a eliminar totalmente la acción de los inhibidores de la plasmina y de los activadores del plasminógeno lo que determina que la relación plasminógeno:plasmina continúe siendo mayor que uno (1,26 +/- 0,28).

Dupont y Grappin, 1998, llegan a la misma conclusión al comprobar que en los quesos semicocidos predomina el plasminógeno, encontrando en su caso que la relación plasminógeno:plasmina es similar a la encontrada en la leche. El valor encontrado por Rampilli para esta relación en los quesos semicocidos fue de 2,0

+/-0,95, y al igual que en nuestra experiencia, no presenta una diferencia significativa con el valor encontrado de plasminógeno:plasmina en los quesos no cocidos.

En el caso de los **quesos cocidos** procesados en la experiencia, Parmesano (C-Pa), Reggiano marca 1 (C-R₁), Reggiano marca 2 (C-R₂), Reggiano marca 3 (C-R₃), Reggianitos Experimentales (PROLAIN), se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las cinco medias presentándose tres grupos. Los mayores valores obtenidos fueron para el Parmesano y el Reggiano marca 1, éstos dos quesos presentaron diferencia significativa con los Reggianitos marca 2 y los Reggianitos Experimentales, los que no se diferencian entre sí conformándose en un segundo grupo. El tercer grupo lo constituyeron los Reggianitos marca 3, siendo éste el orden decreciente en cuanto al contenido de plasmina hallado. Esta diferenciación en tres grupos puede atribuirse a diferencias en la tecnología de elaboración, ó en el proceso de maduración, que no son tan homogéneos como en el caso de los quesos de pasta blanda o semicocida .

El Código Alimentario Argentino define bajo la denominación de queso Parmesano y Reggiano a un mismo tipo de producto elaborado con leche normalizada, acidificada por cultivo de bacterias y coagulada por cuajo y/o enzimas específicas, de masa cocida, pasta dura, con un período de maduración no menor a los seis meses, pudiendo variar éste entre los 6 y los 18 meses.

El contenido de plasmina hallado en los quesos Reggianitos Experimentales elaborados en el PROLAIN, se encuentra dentro del rango de valores evaluados en los Reggianitos comerciales.

En todos los casos los valores de plasmina encontrados en estos quesos son superiores y se diferencian significativamente con los cuantificados en los