

quesos no cocidos y semicocidos. Estos quesos, en su proceso de elaboración, son sometidos a temperaturas de cocción muy elevadas (52° - 55° C), lo que determina la consiguiente inactivación por desnaturalización térmica de los inhibidores del sistema plasmina-plasminógeno.

Esta eliminación de los inhibidores conjuntamente con los prolongados períodos de maduración, determinan la activación del plasminógeno y su conversión a plasmina, llegando a tener ésta los niveles más altos en relación a los niveles encontrados en los quesos no cocidos y los semicocidos, resultando así la relación plasminógeno:plasmina menor que uno.

Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en otras experiencias, donde para los quesos de pasta cocida se encuentran los valores más elevados de plasmina respecto a lo hallado en los quesos con otra cocción. Así Rampilli y Raja en 1998 obtuvieron un valor medio de la relación plasminógeno:plasmina para los quesos cocidos de $0,62 \pm 0,46$; mientras que Dupont y Grappin en el mismo año encontraron para el mismo tipo de quesos una relación de $0,27 \pm 0,08$, en nuestra experiencia se obtuvo una media para dicha relación de $0,60 \pm 0,12$. Cabe destacar que tanto Fox (1.993) como Dupont (1.998) señalan que la inactivación de los inhibidores del sistema enzimático en los quesos duros ocurre durante la elaboración del queso, en el proceso de cocción la cuajada.

Durante la maduración se va presentando un aumento relativo de la plasmina por activación progresiva del plasminógeno. Coincidentemente con lo informado por Rampilli (1.998), en el presente trabajo se encontró en la cuajada del queso Reggianito Experimental elaborado en el PROLAIN una relación plasminógeno : plasmina de $2,96 \pm 0,27$, representando la actividad de plasmina en cuajada el 25% de la actividad total, mientras que luego de los seis meses de maduración de este queso la actividad fue del 59% respecto a la actividad total y

la relación descendió a 0,69 +/- 0,1. Rampilli informó para la cuajada del queso Grana Padano (temperatura de cocción 53-55° C) una relación plasminógeno:plasmina de 3,1 (24% actividad de plasmina respecto al total) y a los cuatro meses de maduración fue de 0,52 (actividad de plasmina del 66% respecto a la actividad total), llegando este coeficiente a los 18 meses de maduración a cero con el 100% de plasmina y ausencia de plasminógeno en el queso.

V. 3. 2. Relación entre los valores de plasmina y el nivel de proteólisis primaria de las caseínas determinadas por electroforesis:

Con la metodología descrita en el Capítulo IV.4, se efectuó la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de urea (Urea-PAGE) con el fin de correlacionar los resultados obtenidos analíticamente en la cuantificación de la actividad de plasmina con la acción proteolítica de esta enzima sobre las caseínas en los distintos tipos de quesos.

Para ello se seleccionaron entre los distintos quesos a los que se les determinó la actividad de plasmina muestras correspondientes a: un queso no cocido: Blanco marca 1, quesos semicocidos: Provolone, Holanda y Gouda, y quesos cocidos : Reggianitos marca 1, marca 2 y marca 3. Conjuntamente con estas muestras se corrió caseinato de sodio como control.

La imagen electroforética de las muestras se observan en la figura V.22 .

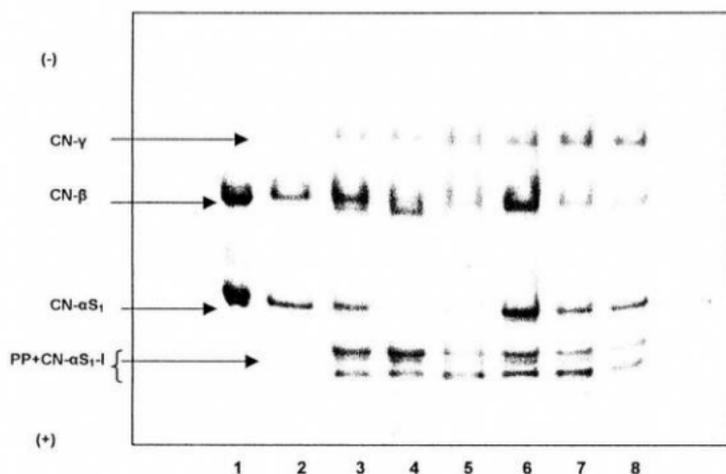


Fig.V.22. Electroforesis UREA-PAGE. Carriles sembrados con: 1:caseinato patrón, 2 : queso Blanco 1, 3 : queso Provolone, 4 : queso Holanda, 5 : queso Gouda, 6 : queso Reggianito 3, 7: queso Reggianito 2, 8 : queso Reggianito 1.

Las bandas electroforéticas fueron cuantificadas por medio de una densitometría para cada muestra. Con los resultados de esta cuantificación se determinó un índice de proteólisis de la caseína- β , definido como:

$$\frac{CN - \gamma}{CN - \gamma + CN - \beta} \times 100 = \text{índice de proteólisis de caseína-}\beta \quad (\text{Ecuación 3})$$

En la tabla V.17 se expresan para cada queso analizado, los valores de plasmina, el pH, los porcentajes de caseína- β , αS_1 , y αS_1 -I y los índices de proteólisis de la caseína- β y de la caseína- αS_1 , éste definido como:

$$\frac{CN - \alpha S_1}{CN - \alpha S_1 + CN - \alpha S_1-I} \times 100 = \text{índice de proteólisis de caseína-}\alpha S_1 \quad (\text{Ecuación 4})$$

Queso	Caseinato	NC-B ₁	SC-Pr	SC-Ho	SC-Go	C-R ₃	C-R ₂	C-R ₁
mg.p-nitroanilina/g.queso		0,053	0,079	0,136	0,138	0,121	0,156	0,235
ug.plasmina/g.		4,99	7,26	12,34	12,55	11,06	14,11	21,18
pH		4,74	5,26	5,51	5,38	5,34	5,39	5,34
β-CN (%)	48,18	44,32	37,72	40,76	24,02	30,3	17,57	22,98
γ-CN (%)			7,32	7,77	13,94	13,94	21,76	35,18
$\frac{CN - \gamma}{CN - \beta + CN - \gamma}$ (%)			16,25	16	36,7	31,5	55,3	60,5
CN-α ₁ (%)	40,0	50,64	17,34	1,10	7,30	24,5	23,80	20,54
CN-α ₁ -I (%)			21,76	38,62	16,3	18,31	15,29	8,95
$\frac{CN\alpha_1 I}{CN\alpha_1 + CN\alpha_1 I}$ (%)			55,6	97,2	69,1	42,8	39,1	30,3
PP (%)			9,75	11,75	24,44	10,78	21,58	12,35

Tabla V.17. Densitometría de la electroforesis UREA-PAGE de muestras de quesos .

Se observa que a medida que aumenta el contenido de plasmina, disminuye la fracción correspondiente a la caseína-β, y aumenta la fracción de las caseínas-γ. Esto se expresa gráficamente en la Fig.V.23 a través de una regresión lineal, donde los estadísticos de dicha regresión indican un valor de p en el análisis ANOVA menor a 0,01 indicando una relación significativa entre la actividad de plasmina hallada (μg.plasmina/g.queso) y el índice de proteólisis de la caseína-β con un nivel de confianza de 99%. Dicha regresión tiene un coeficiente de regresión de 0,887, se corroboró de este modo una buena correlación entre el grado proteólisis de la caseína-β y el contenido de plasmina cuantificado en cada queso.

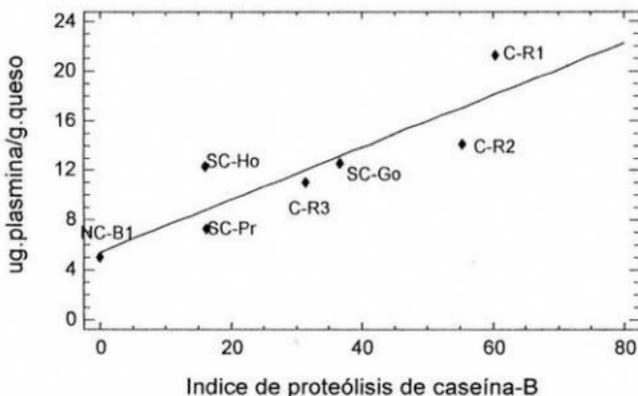


Fig. V.23. Índice de proteólisis de los quesos en relación a la actividad de plasmina observada.

En la figura V.25 se presenta la densitometría del queso Blanco 1 (NC-B₁). El bajo contenido de plasmina encontrado no presentó actividad proteolítica sobre la caseína- β ya que no se observó banda alguna de caseína- γ . Esto es debido a las características del queso, por su pH : 4.59, por un lado es muy poco propicio para la actividad de esta enzima (pH óptimo 7,5) y por otro lado a ese pH se produce la disociación de la plasmina de la caseína; por la presencia de inhibidores del sistema plasmina-plasminógeno en el queso por la ausencia de cocción y por el corto período de maduración. Por otro lado la imagen electroforética que se observó en el queso Blanco (NC-B₁) es muy similar a la del caseinato, lo que podría deberse a que este queso haya sido elaborado a partir de la coagulación de la leche con ácidos orgánicos permitidos (láctico, cítrico, tartárico, acético) motivo por el cuál no queda coagulante residual que produzca la hidrólisis de las caseínas, fundamentalmente de la caseína- α ₁.

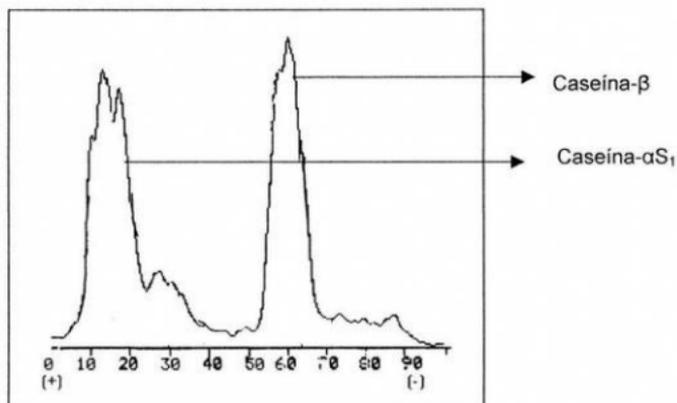


Fig.V.24. Densitometría del Caseinato

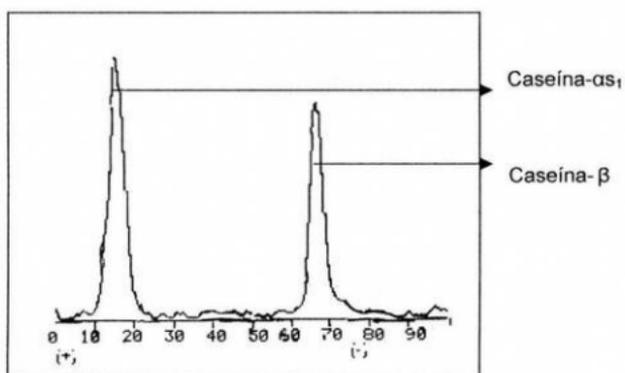


Fig.V.25. Densitometría de queso Blanco 1.

En los quesos cocidos incluidos en la electroforesis : Reggianitos marca 1, marca 2 y marca 3, la eliminación de los inhibidores del sistema plasminógeno-plasmina en el fuerte proceso de cocción y los largos períodos de maduración de estos quesos permiten que el plasminógeno se active a plasmina y ésta ejerza su acción hidrolítica sobre las distintas fracciones de caseína. Por otra parte el pH es más propicio. Así, los elevados niveles de plasmina encontrados por el

método colorimétrico tuvieron su correlación en la actividad proteolítica observada en la electroforesis, teniendo estos quesos Reggianitos 1 y 2 los mayores valores en el índice de proteólisis calculado de la caseína- β (Fig.V.27 y 28). Se observa una menor actividad hidrolítica de la plasmina en el queso Reggianito marca 3, que puede verse en la cuantificación densitométrica (Fig.V.26). Esto puede deberse al proceso tecnológico aplicado en la elaboración de ese Reggianito o a las características de la leche utilizada en su elaboración. La acción proteolítica preponderante de la plasmina en estos quesos duros se ve reforzada por la parcial inactivación de la quimosina u otras proteasas del coagulante que son sensibles a la temperatura de cocción de la cuajada. En la imagen electroforética de estos tres quesos Reggianitos se observa también cierta hidrólisis sobre la caseína- α_s , que no es tan marcada como en los quesos semicocidos dando bandas de elevada movilidad electroforética (similar al péptido α_s -I) y que se podrían atribuir a la enzima coagulante de reactivación (Hynes, E.R., Aparo, L., Candiotti, M.C., 2004).

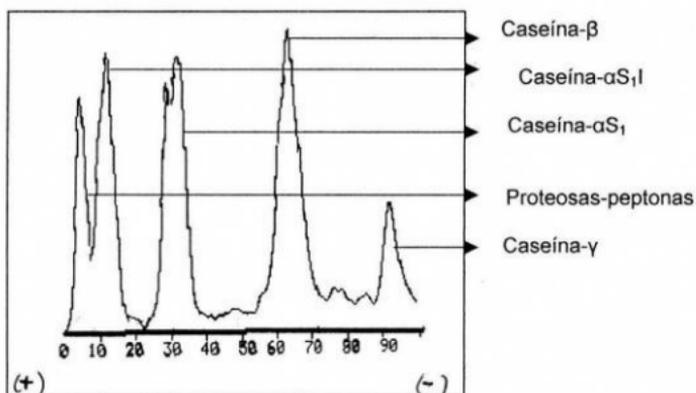


Fig.V.26. Densitometría queso Reggianito 3

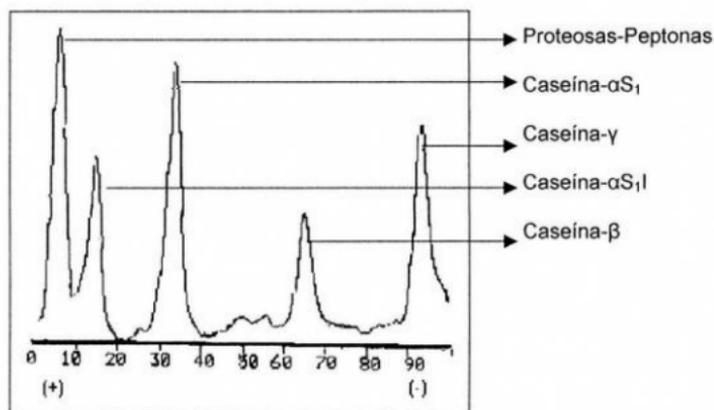


Fig. V.27. Densitometría queso Reggianito 1

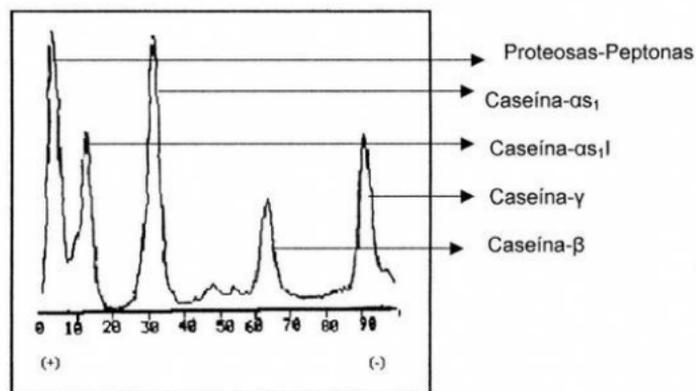


Fig. V.28. Densitometría Reggianito 2

Entre los extremos del queso no cocido (Blanco) y los cocidos (Reggianitos), se encuentran las imágenes electroforéticas de los semicocidos: Provolone, Holanda y Gouda. En el queso provolone, por las condiciones descritas del proceso de hilado de la pasta a pH bajo y lavado, se produce la

disociación de la plasmina y plasminógeno de la caseína y su eliminación de la cuajada. Por ello se encontró una baja actividad de la enzima por el método colorimétrico lo que se plasmó en la electroforesis con un bajo índice proteolítico de la caseína- β (Fig.V.29).

Por otro lado, el índice de proteólisis de la caseína- β encontrado en el queso Gouda es mayor que en el Holanda (Fig.V.30 y 31). Esto podría deberse a que en el proceso de elaboración del queso Gouda se reemplaza parte del suero por agua, lo que conlleva la remoción en una mayor proporción de los inhibidores de la plasmina y de los activadores del plasminógeno (Farkye, Fox, 1990; Fox, Stepaniak, 1993).

Tanto en el queso Holanda como en el Gouda se observó en la imagen electroforética una acción hidrolítica sobre la caseína- α_1 , mucho mayor a la encontrada en los quesos cocidos, siendo casi total en el queso Holanda con un índice de proteólisis de esta caseína del 97,2%. Esta acción enzimática tan importante sobre la caseína- α_1 estaría a cargo de la quimosina. Estas observaciones son coincidentes con lo informado por de Visser y Groot Moster (1977) quienes encontraron que en un queso Gouda luego de seis meses de maduración, la caseína- α_1 fue totalmente hidrolizada y la caseína- β en el 50%. Las temperaturas de cocción de la cuajada en estos quesos no son tan elevadas (35-45° C), lo que explicaría las mas bajas actividades de plasmina encontradas en relación a los quesos cocidos y determinaría que ésta no juegue un rol importante en la acción proteolítica durante la maduración de los quesos semiduros. Por otro lado, a dicha temperatura la quimosina no ha sido inactivada totalmente, ejerciendo su acción.

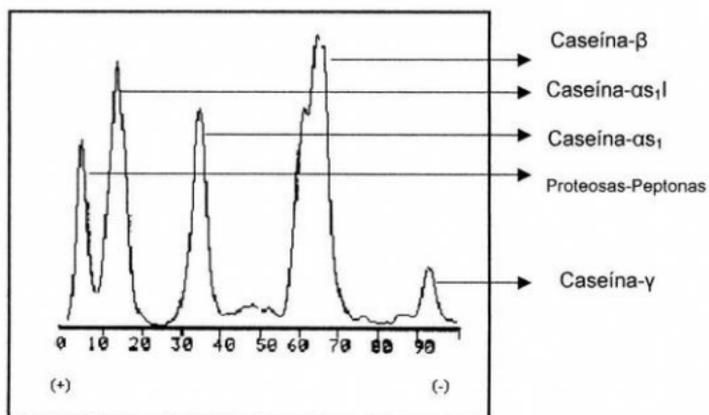


Fig. 29. Densitometría de queso Provolone

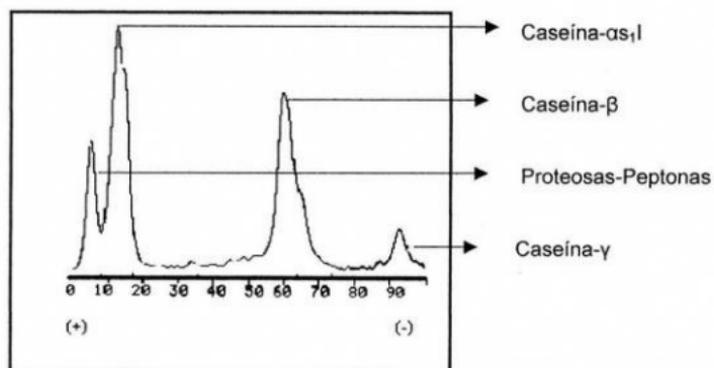


Fig. V.30. Densitometría queso Holanda.

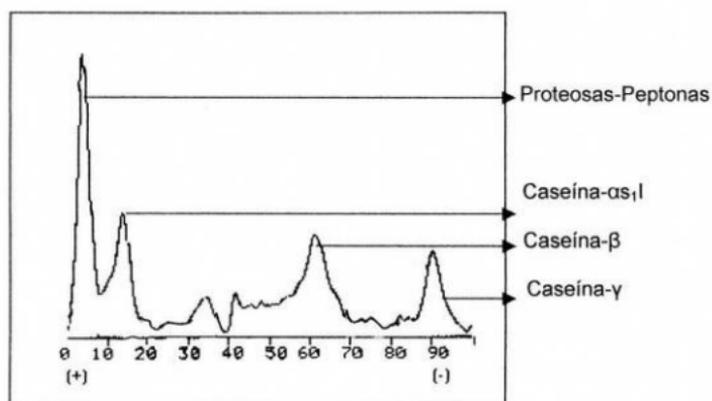


Fig. V.31. Densitometría queso Gouda

Los patrones electroforéticos encontrados son, en general, similares a otras experiencias (Farkye, Fox, 1992; Ollikainen, Kivela, 1989; Bastian, 1997; Fox, Mc Sweeney, 1996) donde, se observó que si la combinación de los parámetros tecnológicos de elaboración del queso son propicios: cocción de la cuajada, pH, tiempo de maduración prolongado, la banda de caseína-β disminuye mientras que se incrementa la de caseína-γ. (Rampilli, Raja, 1998; Dupont, Grappin, 1998; Ollikainen, Nyberg, 1988; Ollikainen, Kivela, 1989; Farkye, Landkammer, 1992; Boudjella, 1994; Fox, Stepaniak, 1993).

Capítulo VI

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

Se determinaron las actividades de plasmina y plasminógeno en quesos comerciales Argentinos y en quesos Reggianitos experimentales elaborados en la planta piloto del PROLAIN. Se analizaron los resultados obtenidos en relación a ciertos parámetros generales de la tecnología de elaboración de estos quesos, fundamentalmente : temperatura de cocción de la cuajada, tiempo de maduración y pH del queso, ya que son preponderantemente éstos parámetros los que influyen tanto en el contenido como en la actividad del complejo enzimático en estudio. También se evaluaron los resultados hallados a través de la acción hidrolítica concreta de la plasmina sobre su principal sustrato: la caseína- β .

Se realizó una revisión de diversos métodos para la determinación de la actividad de plasmina y plasminógeno en productos lácteos, se seleccionó y adaptó el más apropiado para la cuantificación de estas enzimas en los quesos argentinos que se estudiaron.

Se seleccionaron los distintos tipos de quesos según la característica tecnológica de elaboración en cuanto a la temperatura de cocción de la cuajada establecida por el Código Alimentario Argentino. De este modo se trabajó sobre 14 quesos comerciales distribuidos en 4 no cocidos, 6 semicocidos, 4 cocidos; y 3 quesos cocidos de elaboración propia más una cuajada con la que se elaboró uno de estos quesos.

Entre los quesos no cocidos no se observó diferencia estadística en los valores de plasmina hallados. Sí hubo diferencia dentro de cada grupo de los quesos semicocidos y cocidos . Así, dentro de los 6 quesos semicocidos ensayados sólo uno se diferenció estadísticamente con valores de plasmina menores del resto, y este queso diferente coincidió en tener características de elaboración bastante diferentes al resto, ya que se trataba de un queso de pasta

hilada, es decir, que conlleva un proceso de "lavado" de la pasta que en este caso, además, se realiza a bajo pH, todas condiciones que determinan los resultados encontrados. Dentro de los quesos duros se encontraron tres grupos diferentes incluidos los quesos reggianitos experimentales. Estas diferencias se pueden atribuir a parámetros tecnológicos diferentes utilizados en cada establecimiento elaborador de donde provinieron los quesos (concentración y tiempo de salado, temperatura de cámara en el período de maduración, tiempo de maduración características de la leche utilizada, etc.) que pueden influir sobre la concentración y la actividad de la plasmina en los quesos. Se debe señalar que las normas legales existentes en Argentina (C.A.A., Resoluciones del MERCOSUR) definen los quesos desde un punto de vista general, estableciendo ciertas condiciones que debe reunir cada tipo, pero es poco lo que establecen en relación a las características de tipicidad o a los procesos de elaboración y maduración (Zalazar, C., Meinardi, C., Hynes, E., 1.999).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas, tanto en las medias individuales como en las generales, al comparar los grupos de quesos no cocidos con los semicocidos y los cocidos. En ambos casos los no cocidos tuvieron menor actividad de plasmina que los otros dos grupos, siendo la causa más probable de estas diferencias fundamentalmente la no cocción de la cuajada y los cortos tiempos de maduración de los quesos frescos.

Al comparar las medias individuales de los quesos semicocidos con las de los cocidos, se presentan ciertos quesos semicocidos que no se diferencian (por salud) de algunos quesos cocidos (reggianitos), pero al comparar las medias generales de los quesos semicocidos con la de los cocidos hay diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos: siempre los quesos semicocidos tuvieron menos plasmina que los cocidos.

El complejo enzimático, está compuesto por plasmina, su precursor inactivo el plasminógeno y activadores e inhibidores de este sistema. El 80% del total de actividad de plasmina en la leche se encuentra como plasminógeno y se va activando según los procesos tecnológicos a los que es sometida la leche en la elaboración de los distintos productos lácteos. Por este motivo en el presente trabajo también se cuantificó el plasminógeno presente en los quesos.

Se determinó el plasminógeno en 19 quesos, 5 no cocidos, 7 semicocidos y 7 cocidos. El estudio analítico se hizo comparando la relación plasminógeno:plasmina entre los tres grupos de quesos. Se encontró que no hubo diferencia significativa en la relación encontrada en los quesos no cocidos y semicocidos, siendo de 1,31 y 1,26 respectivamente. Sí hubo diferencia entre éstos y la relación plasminógeno:plasmina encontrada en los quesos cocidos, la que descendió a 0,60, pudiéndose atribuir este resultado al proceso de elevadas temperaturas a la que se someten las cuajadas de los quesos cocidos, lo que elimina inhibidores del complejo enzimático y permite la activación del plasminógeno a plasmina.

Por otro lado, las elaboraciones a escala laboratorio de quesos reggianitos, permitieron determinar la actividad del complejo enzimático en la cuajada y en el queso que se obtuvo de la misma, encontrándose diferencias significativas en la relación plasminógeno:plasmina entre la cuajada ($r=2,96$) y el queso al final del estacionamiento ($r=0,69$). Esto es consecuencia de las temperaturas de cocción de esta cuajada (51°C) y del tiempo relativamente largo de maduración (180 días).

Mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida adicionada de urea se visualizó la proteólisis primaria, mediante la densitografía del gel se cuantificó la misma y se calculó un índice de proteólisis de la caseína- β para cada queso

sembrado. Se obtuvo una muy buena correlación entre los valores encontrados de plasmina con el método colorimétrico aplicado y la efectiva acción proteolítica de la enzima sobre la caseína- β . Se encontró que fue mayor el índice de proteólisis de esta caseína a medida que fueron mayores los valores de plasmina hallados. Estos resultados no sólo están ligados a una mayor o menor cantidad de plasmina en el queso, sino probablemente también, a los tiempos de maduración, el pH del queso y a la temperatura utilizada en la cámara de maduración.

Es de destacar que los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron discutidos personalmente con el Dr. Marco Rampilli, Investigador del Istituto Sperimentale Lattiero Caseario de Lodi, Italia, quien en el mes de octubre de 2.003 estuvo presente en nuestra ciudad en ocasión de el dictado de un curso de post-grado sobre el "Rol y actividad de las enzimas coagulantes y del sistema plasmina-plasminógeno en los productos lácteos". El Dr. Rampilli trabajó también sobre este tema, habiendo publicado en 1.998 "Osservazioni sull'attività di plasmina e plasminogeno nel formaggio". En tal oportunidad se efectuó un análisis comparativo de los valores encontrados en cada experiencia y a consideración del mencionado investigador los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron coincidentes con los valores encontrados en los quesos italianos. Efectivamente, en la mencionada publicación se encontraron valores de la relación plasminógeno:plasmina muy similares. Al igual que en nuestro trabajo, no se halló diferencia significativa de la dicha relación entre los quesos no cocidos y los semicocidos, siendo ésta de $2 \pm 0,60$ y de $2 \pm 0,95$ respectivamente, mientras que la relación en la cuajada con la que se elaboró un queso cocido fue de 3,1, y posteriormente a su maduración, en el queso (Grana Padano) se informó una relación de 0,52.

Es igualmente importante señalar que el presente, es un trabajo original en nuestro país ya que no hay publicaciones al respecto, siendo éstos los primeros valores encontrados en cuanto a la valoración de plasmina en quesos típicos argentinos. Las publicaciones existentes a nivel internacional sobre el tema no son tampoco numerosas ya que, este es un tema que ha sido abordado con intensidad desde hace relativamente poco tiempo.

Se hace necesario continuar los estudios a los efectos de determinar exactamente las condiciones tecnológicas óptimas (temperaturas de cocción y maduración, pH, tiempos de maduración, concentración y tiempo de salado, etc.) ya sea para inhibir o para estimular la acción de esta enzima para cada tipo de queso según convenga para mejorar sus características sensoriales. Por otra parte, hay grupos de investigación que aseguran el rol beneficioso de la plasmina en las características finales de los quesos, motivo por el cual se está estudiando la adición de esta enzima como tal o bien incidir sobre los factores activadores de su precursor, para acelerar los procesos de maduración y mejorar las características organolépticas generales de los quesos.

ANEXOS

ANEXO I

I. REACTIVOS UTILIZADOS EN LA DETERMINACIÓN DE PLASMINA Y PLASMINÓGENO:

I.1. Buffer de reacción :

TRIS (Sigma, T 1378) 0.05 M en NaCl (Cicarelli, A.C.S., pro-análisis) 0.1M ajustando el pH a 7.4 con HCl (Cicarelli, A.C.S, pro-análisis).

I.2. Sustrato de reacción:

Tripéptido cromogénico: D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilina di-hidrocloruro (Sigma Chemical Co., V 7127), 4,5 mM en buffer de reacción.

I.3. Solución curva p-nitroanilina:

Para-nitroanilina (Pro-Análisis, Bruxellas-r.c.b 85.078), 6 mM en el buffer de reacción.

I.4. Solución curva plasmina:

Plasmina (Sigma Chemical Co.,P-7911), solución madre 160 µg/ml en el buffer de reacción.

I.5. Activador del plasminógeno:

Uroquinasa (Sigma Chemical Co., U 5004), solución 15U/ml en buffer de reacción.

II. REACTIVOS UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN DEL QUESO REGGIANITO ARGENTINO EN LA PLANTA PILOTO DEL PROLAIN :

II.1. CaCl₂ concentración final de 0.02 % (w/ v)

II.2. Enzima coagulante de la leche:

Coagulante bovino adulto 230 IMCU/ml (Naturen de Chr. Hansen, Quilmes, Argentina).

II.3. Solución de salado:

Salmuera al 20% (w / v).

III. REACTIVOS UTILIZADOS EN LA ELECTROFORESIS UREA- PAGE:

III.1. Solución de Acrilamida - Bisacrilamida 30,8%:

Acrilamida: 30 g

Bisacrilamida: 0,8 g

Se disuelven en 80 ml de agua destilada, se filtra y completa el volumen a 100 ml. (Conservar en frasco color caramelo).

III.2. Buffer de electrodo o de corrida :

Glicina: 14,4 g (0,192 M)

Tris base: 3 g (0,025 M)

Se disuelve en agua destilada, se ajusta el pH a 8,3 con HCl concentrado, y se completa el volumen hasta 1 litro.

III. 3. Buffer del gel separador:

Tris base: 18,3 g (1 M)

TEMED: 0,4 ml

Se disuelve en agua destilada, se ajusta el pH a 8,3 con HCl concentrado y se completa el volumen hasta 100 ml.

III.4. Buffer stacking:

Tris base: 3 g (0,5 M)

Se disuelve en agua destilada, se ajusta el pH a 8,3 con HCl concentrado y se completa el volumen hasta 50 ml.

III.5. Buffer de muestra:

Buffer stacking: 4 ml

Urea: 3,36 g

Azul de Bromofenol: punta de espátula

Merceptoetanol: 5% (cuando se considere necesario)

Se disuelve en agua destilada hasta completar 8 ml.

III.6. Persulfato de amonio:

Se disuelve en 0,05 g de Persulfato de amonio en 0,5 ml de agua destilada

(10%). Se debe preparar en el momento de uso.

III.7. Solución colorante:

Coomasie Blue R: 1,92 g

Alcohol etílico: 400 ml

Ácido acético: 160 ml

Agua destilada: 400 ml

Se agita y se filtra.

III.8. Solución decolorante:

Etanol o metanol: 250 ml

Ácido acético: 100 ml

Agua destilada: 650 ml

III.9. Gel de separación - T: 7,5%:

Cantidades para dos placas de 1 mm de espesor, con 8 ml por placa (total 16 ml).

Solución de acrilamida al 30,8% 4 ml

Buffer de separación 4 ml

Urea 6,72 g

Agua destilada: cantidad suficiente para 16 ml

Solución de persulfato de amonio 36 μ l

III.10. Gel de Stacking - T: 4,0%:

Cantidades para dos placas de 1 mm de espesor, con 5 ml por placa (total 10 ml).

Solución de acrilamida al 30,8%	1,3 ml
Buffer Stacking (Tris - HCl)	2,5 ml
Agua destilada	6,1 ml
TEMED	10 µl
Solución de persulfato de amonio	36 µl

IV. EQUIPAMIENTO UTILIZADO:

IV.1. Baño maría (TECAM[®], Argentina) termostatzado a 37° C .

IV.2. Espectrofotómetro UV-VIS, (Metrolab 1700[®], Argentina).

IV.3. Vórtex Standard 10, (Fab. Aparatos Científicos FAC[®], Argentina).

IV.4. Macrocentrífuga (Rolco[®], Argentina) .

IV. 5. Microcentrífuga (ECYS[®], Argentina).

IV.6. Cuba de electroforesis modelo Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories[®], California, Estados Unidos).

IV.7. Fuente de energía Model 1000/500 (Bio-Rad Laboratories[®], California, Estados Unidos).

IV.8. Densitómetro Minidensit (SEAC[®]. Italia).

IV.9. Peachímetro manual (Horiba Ltd[®]., Japón) .

IV. 10. Peachímetro de mesa (Tipo E 5116, titriskop, Metrohm Herisau[®], Switzerland).

ANEXO II

II. 1. CURVA DE CALIBRADO CON P-NITROANILINA :

Parámetros estadísticos de la regresión lineal:

Parámetro	Estimación	Error Estándar	t-test	Valor de p
a	0.0201	0.00137	14,630	0,0000
b	0.0759	0.00045	169,384	0,0000
r	0.999			

Ax.II.Tabla 1. Estimadores de la curva de calibrado con p-nitroanilina

II. 2. CURVA DE CALIBRADO CON PLASMINA :

Parámetros estadísticos de la regresión lineal:

	Estimación	Error Estándar	t-test	Valor de p
a	0.0173	0.00528	3,222	0,004
b	0.0355	0.00052	68,227	0,000
r	0.994			

Ax.II.Tabla 2. Estimadores de la curva de calibrado con plasmina.

ANEXO III

III. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS EN QUESOS:

III.1. Quesos no cocidos :

III.1.a. Análisis estadístico de los resultados expresados como mg p-nitroanilina/ g.queso :

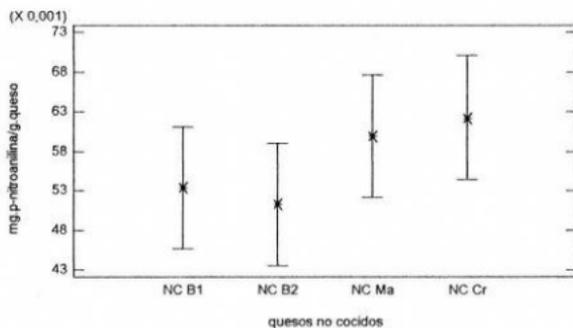
	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	0,00040495	3	0,00013498	1,01	0,4131
Dentro de grupos	0,0021336	16	0,00013335		

Ax.III. Tabla 1. Quesos No Cocidos. Análisis estadístico (mg p-nitroanilina/g. queso)

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
NC B2	5	0,0512	X
NC B1	5	0,0534	X
NC Ma	5	0,0598	X
NC Cr	5	0,0622	X

Ax.III. Tabla 2. Quesos No Cocidos. Grupos Homogéneos. (mg p-nitroanilina/g. queso)



Ax.III. Fig. 1. Valores de plasmina en quesos no cocidos comerciales (mg p-nitroanilina /gr. queso). (Valor medio+/-LDS, 95%)

III.1.b. Análisis estadístico de los resultados expresados como microgramos de plasmina por gramo de queso :

	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	3,2345	3	1,07817	1,01	0,4127
Dentro de grupos	17,0261	16	1,06413		

Ax.III. Tabla 3. Quesos No Cocidos. Análisis estadístico. (μg plasmina/g queso).

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
NC B2	5	4,788	X
NC B1	5	4,992	X
NC Ma	5	5,566	X
NC Cr	5	5,77	X

Ax.III. Tabla 4. Quesos No Cocidos. Grupos Homogéneos. (μg plasmina/g queso)

III. 2. Quesos Semicocidos:

II.2.a. Análisis estadístico de los resultados expresados como mg p-nitroanilina/g.queso:

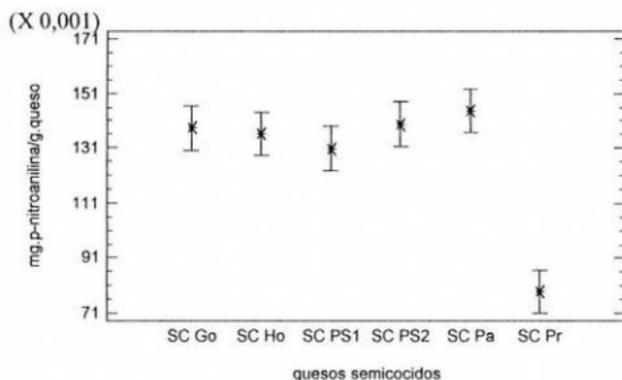
	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	0,0149743	5	0,00299486	19,97	0,0000
Dentro de grupos	0,0035984	24	0,000149933		

Ax.III. Tabla 5. Quesos Semicocidos (mg p-nitroanilina/g queso). Análisis estadístico.

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
SC Pr	5	0,079	X
SC PS1	5	0,131	X
SC Ho	5	0,136	X
SC Go	5	0,138	X
SC PS2	5	0,140	X
SC Pa	5	0,145	X

Ax.III. Tabla 6. Quesos semicocidos. Grupos Homogéneos (mg p-nitroanilina/g.queso)



Ax.III.Fig.2. Valores plasmina en quesos semicocidos comerciales (mg p-nitroanilina/gr. queso). (Valor medio \pm LDS, 95%)

III.2.b. Análisis estadístico de los resultados expresados como microgramos de plasmina por gramo de queso :

	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	119,847	5	23,9695	20,21	0,0000
Dentro de grupos	28,4684	24	1,18618		

Ax.III. Tabla 7. Quesos Semicocidos (μ g plasmina/g queso). Análisis estadístico.

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
SC.Pr.	5	7,256	X
SC.PS1	5	11,874	X
SC.Ho.	5	12,366	X
SC.Go.	5	12,55	X
SC.PS2.	5	12,704	X
SC.Pa.	5	13,126	X

Ax.III. Tabla 8. Quesos semicocidos. Grupos Homogéneos (μ g plasmina/g queso)

III.3. Quesos Cocidos:

III.3.a. Análisis estadístico de los resultados expresados como mg p-nitroanilina/g queso:

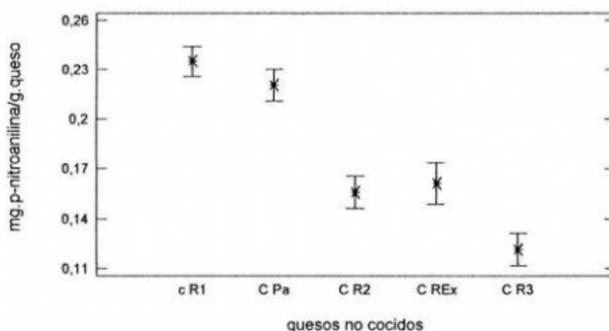
	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	0,0444652	4	0,0111163	55,59	0,0000
Dentro de grupos	0,0035992	18	0,000199956		

Ax.III.Tabla 9. Quesos Cocidos (mg.p-nitroanilina/g. queso). Análisis estadístico.

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
C R3	5	0,121	X
C R2	5	0,156	X
C REx	3	0,161	X
C Pa	5	0,220	X
c R1	5	0,235	X

Ax.III.Tabla 10. Quesos cocidos. Grupos Homogéneos.(mg.p-nitroanilina/g. queso)



Ax.III.Fig.3. Valores medios de plasmina en quesos cocidos comerciales y experimentales (mg p-nitroanilina /g queso). (Valor medio+/-LDS, 95%).

III.3.b. Análisis estadístico de los resultados expresados como microgramos de plasmina por gramo de queso :

	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	352,349	4	88,0874	55,24	0,0000
Dentro de grupos	28,7009	18	1,5945		

Ax.III.Tabla 11. Quesos Cocidos (μ g.plasmina/g queso). Análisis estadístico.

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
C.R3.	5	11,062	X
C.R2.	5	14,11	X
C.REx.	3	14,5667	X
C.Pa.	5	19,858	X
C.R1.	5	21,176	X

Ax.III.Tabla 12. Quesos cocidos. Grupos Homogéneos. (μg plasmina/g. queso)

III.4. Análisis de los valores encontrados en los quesos Reggianitos

Experimentales elaborados en el PROLAIN :

III.4.a. Análisis estadístico de los resultados expresados como mg p-nitroanilina/g. queso:

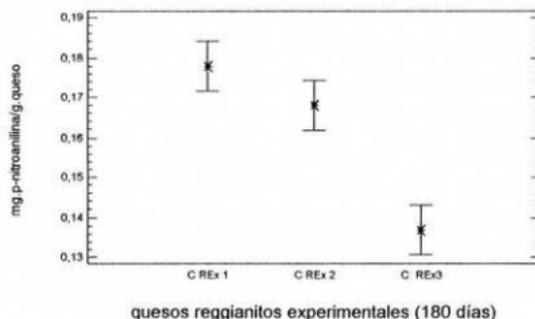
	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	0,00458413	2	0,00229207	28,6	0,0000
Dentro de grupos	0,0009616	12	0,00008013		

Ax.III.Tabla 13. Quesos Reggianitos Experimentales (mg p-nitroanilina /g queso). Análisis estadístico.

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
C REx3	5	0,137	X
C REx 2	5	0,168	X
C REx 1	5	0,178	X

Ax.III.Tabla 14. Quesos reggianitos experimentales. Grupos Homogéneos. (mg p-nitroanilina/g. queso)



Ax.III. Fig. 4. Valores medios de plasmina en quesos Reggianitos Experimentales (mg p-nitroanilina /g. queso). (Valor medio+/-LDS, 95%).

III.4.b. Análisis estadístico de los resultados expresados como microgramos de plasmina por gramo de queso :

	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	36,6303	2	18,3151	28,72	0,0000
Dentro de grupos	7,65224	12	0,637687		

Ax.III.Tabla 15. Quesos Reggianitos Experimentales (μg plasmina /g. queso). Análisis estadístico.

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
C.REx3.	5	12,414	X
C.REx2.	5	15,224	X
C.REx1.	5	16,07	X

Ax.III.Tabla 16. Quesos reggianitos experimentales. Grupos Homogéneos (μg plasmina/g queso)

III. 5. Relación plasminógeno : plasmina en quesos comerciales :

III.5.a. Análisis estadístico de los resultados expresados como microgramos de p-nitroanilina por gramo de queso :

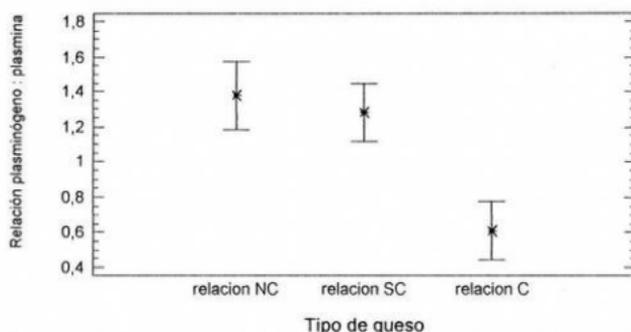
	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	2,24071	2	1,12036	13,27	0,0004
Dentro de grupos	1,35201	16	0,08450		

Ax.III.Tabla 17. Relación plasminógeno : plasmina en quesos comerciales (mg.p-nitroanilina /g queso). Análisis estadístico.

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
relacion C	7	0,61	X
relacion SC	7	1,28	X
relacion NC	5	1,38	X

Ax.III.Tabla 18. Relación plasminógeno : plasmina en quesos comerciales . Grupos Homogéneos.(mg p-nitroanilina/g.queso)



Ax. III. Fig. 5. Relación plasminógeno : plasmina en quesos comerciales (mg p-nitroanilina /g. queso). (Valor medio \pm LDS, 95%).

III.5.b. Análisis estadístico de los resultados expresados como microgramos de plasmina por gramo de queso :

	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	2,05101	2	1,02551	13,22	0,0004
Dentro de grupos	1,24088	16	0,07755		

Ax. III. Tabla 19. Relación plasminógeno : plasmina en quesos comerciales (μ g. plasmina /g. queso). Análisis estadístico.

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
relacion C	7	0,6	X
relacion SC	7	1,26	X
relacion NC	5	1,31	X

Ax. III. Tabla 20. Relación plasminógeno : plasmina en quesos comerciales . Grupos Homogéneos. (μ g. plasmina/g. queso)

III.6. Variación de la actividad de plasmina y plasminógeno entre la cuajada y el queso reggianito experimental al final de la maduración:

III.6.a. Análisis estadístico de los resultados expresados como mg p-nitroanilina/g. queso:

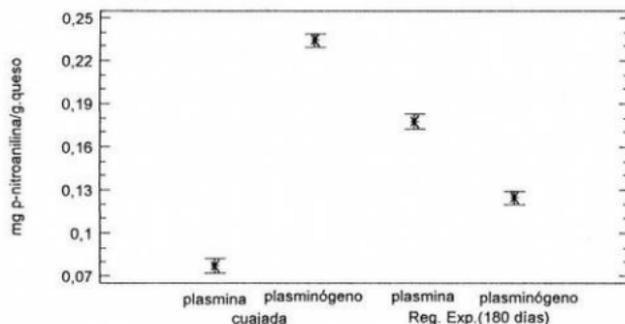
	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	0,0688482	3	0,0229494	403,51	0,000
Dentro de grupos	0,00091	16	0,000056875		

Ax.III Fig.21. Plasmina y plasminógeno en cuajada y el reggianito experimental (mg p-nitroanilina/g). Análisis estadístico.

Method: 95,0 percent LSD

Count	Mean	Homogeneous Groups
cuajada plasmin5	0,077	X
reg plasminogen5	0,124	X
reg plasmina 5	0,178	X
cuajada plasmin5	0,234	X

Ax.III. Tabla 22. Plasmina y plasminógeno en cuajada y el reggianito experimental . Grupos Homógeneos. (mg p-nitroanilina/g. queso)



Ax.III. Fig.6. Plasmina y plasminógeno en cuajada y el reggianito experimental (mg p-nitroanilina/g. queso) . (Valor medio \pm LDS, 95%).

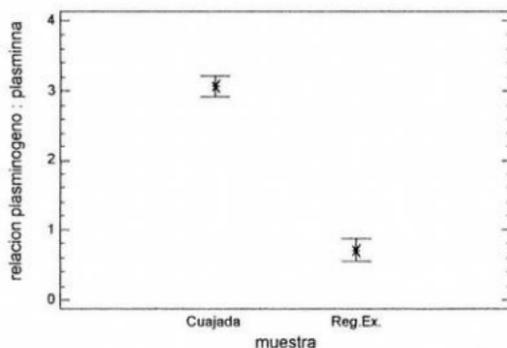
	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	13,9358	1	13,9358	314,99	0,0000
Dentro de grupos	0,353936	8	0,044242		

Ax.III. Tabla 23. Relación plasminógeno : plasmina en cuajada y reggianito experimental (mg p-nitroanilina /g. queso). Análisis estadístico.

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
reg relacion	5	0,70	X
cuajada relacio5		3,06	X

Ax.III.Tabla 24. Relación plasminógeno : plasmina en cuajada y el reggianito experimental . Grupos Homogéneos. (mg.p-nitroanilina/g.queso)



Ax.III.Fig.7. Relación plasminógeno : plasmina en cuajada y el reggianito experimental (mg.p-nitroanilina/g.queso) . (Valor medio+/-LDS, 95%).

III.6.b. Análisis estadístico de los resultados expresados como microgramos de plasmina por gramo de queso :

	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	539,52	3	179,839	403,83	0,0000
Dentro de grupos	7,12528	16	0,44533		

Ax.III.Fig.25 Plasmina y plasminógeno en cuajada y el reggianito experimental (μg plasmina/g). Análisis estadístico.

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
plasmina cuajad5		7,088	X
plasminogeno RE5		11,1	X
plasmina REX 5		16,07	X
plasminogeno cu5		20,9	X

Ax.III.Tabla 26. Plasmina y plasminógeno en cuajada y el reggianito experimental . Grupos Homogéneos. (μg .plasmina/g.queso)

	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	12,905	1	12,905	335,19	0,0000
Dentro de grupos	0,308	8	0,0385		

Ax.III.Tabla 27. Relación plasminógeno : plasmina en cuajada y reggianito experimental (μg . plasmina /g. queso). Análisis estadístico.

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
relacion REx	5	0,692	X
relacion cuajad5		2,964	X

Ax.III.Tabla 28. Relación plasminógeno : plasmina en cuajada y el reggianito experimental . Grupos Homogéneos. (μg . plasmina/g queso)

III.7. Análisis estadístico del pH medido en los distintos tipos de quesos:

	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	0,29571	2	0,147855	2,15	0,1587
Dentro de grupos	0,823583	12	0,0686319		

Ax.III.Tabla 29. pH en distintos tipos de quesos. Análisis estadístico.

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
no cocidos	4	5,03	X
coc.	5	5,34	X
semicoc.	6	5,36	X

Ax.III.Tabla 30. pH en distintos tipos de quesos. Grupos Homogéneos.

III.8. Análisis estadístico comparativo entre los distintos tipos de queso:

III.8.1. Comparativo entre quesos no cocidos-semicocidos :

III.8.1.a. Análisis estadístico de los resultados expresados como mg p-nitroanilina/g. queso:

	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	0,0766405	9	0,008516	59,43	0,0000
Dentro de grupos	0,005732	40	0,000143		

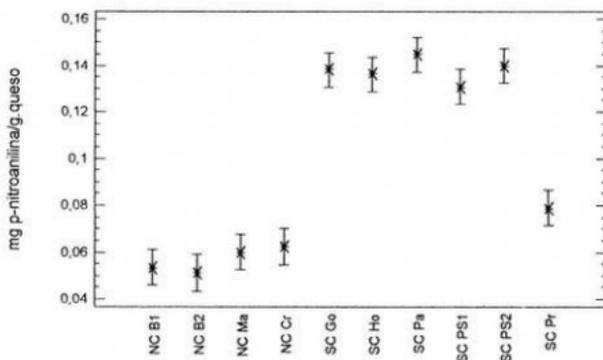
Ax.III.Tabla 31. Comparativo No Cocidos-Semicocidos (mg p-nitroanilina /g. queso). Análisis estadístico.

Anexo III

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
NC B2	5	0,051	X
NC B1	5	0,053	X
NC Ma	5	0,060	X
NC Cr	5	0,062	X
SC Pr	5	0,079	X
SC PS1	5	0,131	X
SC Ho	5	0,136	X
SC Go	5	0,138	X
SC PS2	5	0,140	X
SC Pa	5	0,145	X

Ax.III.32. Comparativo No Cocidos-Semicocidos (mg .p-nitroanilina /g. queso). Grupos Homogéneos.



Ax.III.Fig.8. Comparativo No Cocidos-Semicocidos (mg .p-nitroanilina /g. queso). (Media+/-LSD)

III.8.1.b. Análisis estadístico de los resultados expresados como microgramos de plasmina por gramo de queso :

	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	609,546	9	67,7273	59,55	0,0000
Dentro de grupos	45,4945	40	1,13736		

Ax.III.Tabla 33. Comparativo No Cocidos-Semicocidos (µg .plasmina /g. queso). Análisis estadístico.

Anexo III

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
NC. B2	5	4,788	X
NC. B1.	5	4,992	X
NC. Ma.	5	5,566	X
NC. Cr.	5	5,77	X
SC. Pr.	5	7,256	X
SC. PS1	5	11,874	X
SC. Ho.	5	12,366	X
SC. Go.	5	12,55	X
SC. PS2.	5	12,704	X
SC. Pa.	5	13,126	X

Ax.III.34. Comparativo No Cocidos-Semicocidos (μg . plasmina /g. queso). Grupos Homogéneos.

	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	486,464	1	486,464	138,51	0,0000
Dentro de grupos	168,576	48	3,51201		

Ax.III. Tabla 35. Comparativo medias generales No Cocidos-Semicocidos (μg . plasmina /g. queso). Análisis estadístico.

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Group
no cocidos	20	5,279	X
semicocidos	30	11,646	X

Ax.III.36. Comparativo medias generales No Cocidos-Semicocidos (μg . plasmina /g. queso). Grupos Homogéneos.

III. 8.2. Comparativo quesos no cocidos-cocidos :

III.8.2.a. Análisis estadístico de los resultados expresados como mg p-nitroanilina/g.queso:

	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	0,208327	8	0,0260409	154,44	0,0000
Dentro de grupos	0,0057328	34	0,0001686		

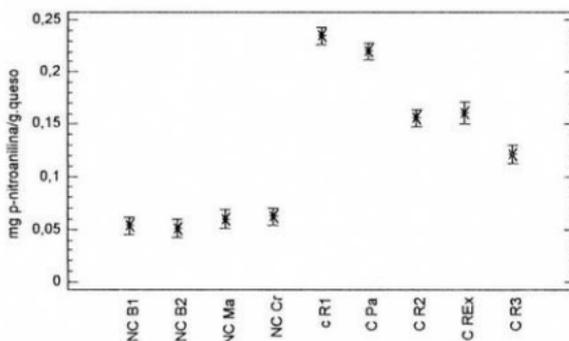
Ax.III. Tabla 37. Comparativo Quesos No Cocidos-Cocidos (mg p-nitroanilina /g. queso). Análisis estadístico

Multiple Range Tests

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
NC B2	5	0,051	X
NC B1	5	0,053	X
NC Ma	5	0,060	X
NC Cr	5	0,062	X
C R3	5	0,121	X
C R2	5	0,156	X
C REx	3	0,161	X
C Pa	5	0,220	X
c R1	5	0,235	X

Ax.III.38. Comparativo No Cocidos-Cocidos (mg .p-nitroanilina /g. queso).Grupos Homogéneos.



Ax.III. Fig.9. Comparativo No Cocidos-Cocidos (mg .p-nitroanilina /g. queso). (Media+/-LSD)

III.8.2.b. Análisis estadístico de los resultados expresados como microgramos de plasmina por gramo de queso :

	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	1653,21	8	206,651	153,65	0,0000
Dentro de grupos	45,727	34	1,34491		

Ax.III. Tabla 39. Comparativo Quesos No Cocidos-Cocidos (µg. plasmina / g.queso). Análisis estadístico.

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
NC.B2	5	4,788	X
NC.B1.	5	4,992	X
NC.Ma.	5	5,566	X
NC.Cr.	5	5,77	X
C.R3.	5	11,062	X
C.R2.	5	14,11	X
C.REx.	3	14,5667	X
C.Pa.	5	19,858	X
C.R1.	5	21,176	X

Ax.III.40. Comparativo No Cocidos-Cocidos (μg plasmina /g. queso). Grupos Homogéneos.

	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	1382,68	1	1382,68	158,74	0,0000
Dentro de grupos	461,655	53	8,71048		

Ax.III. Tabla 41. Comparativo medias generales Quesos No Cocidos-Cocidos (μg plasmina / g. queso). Análisis estadístico.

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
no cocidos	20	5,279	X
cocidos	35	15,702	X

Ax.III.42. Comparativo medias generales No Cocidos-Cocidos (μg plasmina /g. queso). Grupos Homogéneos.

III. 8. 3. Comparativo quesos semicocidos-cocidos :

III.8.3.a. Análisis estadístico de los resultados expresados como mg p-nitroanilina/g.queso:

	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	0,0961525	10	0,00961525	55,62	0,0000
Dentro de grupos	0,0072608	42	0,00017288		

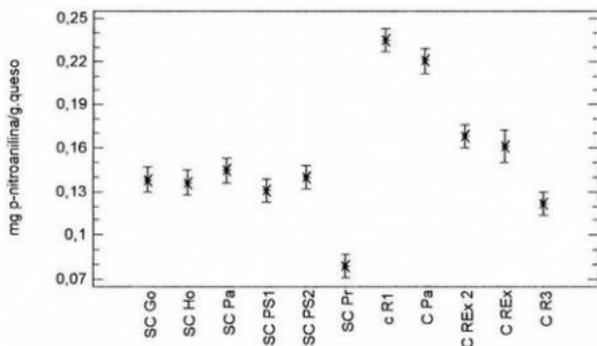
Ax.III. Tabla 43. Comparativo Quesos SemiCocidos-Cocidos (mg p-nitroanilina /g. queso). Análisis estadístico.

Anexo III

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
SC Pr	5	0,079	X
C R3	5	0,121	X
SC PS1	5	0,131	XX
SC Ho	5	0,136	XX
SC Go	5	0,138	X
SC PS2	5	0,140	X
SC Pa	5	0,145	XX
C REx	3	0,161	XX
C REx 2	5	0,168	X
C Pa	5	0,220	X
c R1	5	0,235	X

Ax.III.44. Comparativo quesos Semicocidos-Cocidos (mg .p-nitroanilina /g. queso).Grupos Homogéneos.



Ax.III. Fig. 10. Comparativo Quesos SemiCocidos-Cocidos (mg .p-nitroanilina /g. queso).(Media+/- LSD)

III.8.3.b. Análisis estadístico de los resultados expresados como microgramos de plasmina por gramo de queso :

	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	753,287	10	75,3287	55,34	0,0000
Dentro de grupos	57,1693	42	1,36117		

Ax.III. Tabla 45. Comparativo Quesos SemiCocidos-Cocidos (μ g .plasmina /g. queso). Análisis estadístico.

Anexo III

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
SC.Pr.	5	7,256	X
C.R3.	5	11,062	X
SC.PS1	5	11,874	XX
SC.Ho.	5	12,366	XX
SC.Go.	5	12,55	XX
SC. PS2.	5	12,704	XX
SC.Pa.	5	13,126	XXX
C.R2.	5	14,11	XX
C.REX.	3	14,5667	X
C.Pa.	5	19,858	X
C.R1.	5	21,176	X

Ax.III.46. Comparativo quesos Semicocidos-Cocidos (μg .plasma /g. queso). Grupos Homogéneos.

	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Relación-F	Valor-p
Entre grupos	265,749	1	265,749	28,39	0,0000
Dentro de grupos	589,71	63	9,36048		

Ax.III. Tabla 47. Medias generales quesos SemiCocidos-Cocidos (μg .plasma /g. queso). Análisis estadístico.

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
semicocidos	30	11,646	X
cocidos	35	15,702	X

Ax.III.48. Medias generales quesos Semicocidos-Cocidos (μg .plasma /g. queso). Grupos Homogéneos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aimutis, W. R., Eigel, W. N. (1982). "Identification of lambda casein as plasmin- derived fragments of bovine $\alpha S1$ - casein". J.Dairy Sci. **65**: 175-181.

Alichaniddis, E., Wrathal, J.H.M., Andrews, A.T..(1986). "Heat stability of plasmin (milk proteinase) and plasminogen". L.Dairy Res., **53**: 259-268.

Andrews, A.T. (1983 a). "Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins". J. Dairy Res., **50**:45-54.

Andrews, A.T., Alichanidis, E..(1983). "Proteolysis of caseinns and the proteose-peptone fraction of bovine milk". J.Dairy Res., **50**:275-290.

Andrews, A.T., Olivecrona, T., Bengtsson-Olivecrona, G., Fox, P.F.Bjorck, L., Farkye, N.Y. .(1.991). "Indigenous enzymes in milk". In Food Enzymology, Fox, P.F.(Ed.), Elsevier Science Publishers, London, pp. **53**:129-140.

Andrews, A.T., Olivecrona, T., Bengtsson-Olivecrona, G., Fox, P.F.Bjorck, L., Farkye, N.Y. .(1.992). "Indigenous enzymes in milk". Advanced Dairy Chemistry -1-Proteins, Fox, P.F.(Ed.), Elsevier Science Publishers, London, pp. 285-367.

Andrews, A.T.. (1978b). "The composition, structure and origin of proteose-peptone component 8F of bovine milk". European Journal of Biochemistry, **90** : 67-81.

Andrews, A.T..(1978a). "The composition, structure and origin of proteose-peptone component 5 of bovine milk". European Journal of Biochemistry, **90** : 59-65.

Baldi, A ., Savoini, G., Cheli, F., Fantuz, F., Senatore, E., Bertocchi, L., Politis, I..(1.996). "Changes in Plasmin-Plasminogen-Plasminogen Activator system in milk from Italian Friesian Herds". Int. Dairy Journal, **6**, 1045-1053 .

Barry, J.G., Donnelly, W.J..(1980) "Casein compositional studies. The composition of casein from Friesian herd milks". J.Dairy Res., **47**: 71-86.

Bastian , E.D., Brown, R.J. , Ernstrom, C.A. . (1991). "*Casein interference in bovine plasmin assays using a synthetic substrate*". J.Dairy Sci. 74, 4119-4131.

Bastian, E.D., Brown, R.J..(1996). "*Plasmin in milk and dairy products: An update*". Int. Dairy J., 6:435-457.

Bastian, E.D., Hansen, K.G., Brown, R.J..(1993). "*Inhibition of plasmin by β -lactoglobulin using casein and a synthetic substrate*". J.Dairy Sci., 76: 3354-3361.

Bastian, E.D., Lo, C.G., David, K.M.M..(1997). "*Plasminogen Activation in Cheese Milk: Influence on Swiss Cheese Ripening*". J. Dairy Sci., 80:245-251.

Boudjellab, N., Rolet-Repecaud, O., and Collins, J.C.. (1994). "*Detection of residual chymosin in cheese by an enzyme-linked immunosorbent assay*". J.Dairy Res. . 61 : 101-109.

Código Alimentario Argentino.Edición 1999. Actualizado 2003. Editor De La Canal Y Asoc. S.R.L. Bs. As..

Collin, J.C., Compagnone, P., Ryba, I., Baer, A..(1988). "*Determination of plasmin (alkaline milk proteinase) and chymosin in milk products by the ELISA assay*". Lait, 68, 235-240.

Collin, J.C., Law, B.A.. (1989). "*Isólement et caractérisation de la L-méthionine-G déméthiolase de Brevibacterium linens NCDO 739*".Sci. Aliment. 9: 805-808.

Crudden, A., Kelly, A.L..(2003). "*Studies of plasmin activity in whey*". Int. Dairy Journal, 13: 987-993

Davies, D.T., Law, A.J.R. (1977). "*An improved method for the quantitative fractionation of casein mixtures using ion exchange chromatography*". J.Dairy Re., 44: 213-229.

de Rham, O., Andrews, A.T..(1982). "*The roles of native milk proteinase and its zymogen during proteolysis in normal mastitic milk*". J.Dairy Res., 49: 577-585.

Diessen, F.M., van der Waals, C.B..(1.978). "Inactivation of native milk proteinase by heat treatment". Neth. Milk Dairy J., **32**, 245-254.

Dupont, D., Bailly, C.,Grosclaude, J., Collin, J.C. . (1997)."*Differential titration of plasmin and plasminogen in milk using sándwich ELISA with monoclonal antibodies*". J.Dairy Res., **64**: 77-86.

Dupont, D., Grappin, R.. (1998). "*ELISA for differential quantitation of plasmin and plasminogen in cheese*". Journal of Dairy Research, **65**: 643-651.

Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Farrell, H.M.,Jr., Harwalkar, V. R., Jenness, R., and Whitney, R. McL.. (1984)."*Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision*". J.Dairy Sci.. **67**: 1599-1631.

Eigel, W.N., Keenan, T.W.. (1979)."*Identification of protease peptone component 8-slow as a plasmin-derived fragment of bovine beta-casein*".Int. Journal of Biochemistry, **10** : 529-535.

Eigel, W.N.. (1977). "*Effect of bovine plasmin on alfa-S1-B and k-A caseins*". J.Dairy Sci., **60**, 1399-1403.

Fajardo-Lira, C., Nielsen, S.S..(1998). "*Effect of psychrotrophic microorganisms on the plasmin system in milk*". J.Dairy Sci. , **81**: 901-908.

Farkye, N.Y., FOX, P.F.. (1990). "*Observations on plasmin activity in cheese*". Journal Dairy Research, **57** : 413-418.

Farkye, N.Y., Landkammer, C.F..1.992. "*Milk Plasmin Activity Influence on Cheddar Cheese Quality during Ripening*". J. Food Sci., **57**,(3): 622-639.

Fersht, A..1.980. "*Estructura y mecanismo de los enzimas*". Edit. Reverté.

Fox, P.F., Law, J., McSweeney, P.L.H., and Wallace, J., (1993)."*Biochemistry of cheese ripening*" in *Cheese : Chemistry, Physics and Microbiology*. 1. P.F.Fox, (Ed.), Chapman and Hall, London, 389-438.

Fox, P.F., Mc Sweeney, P.L.H. . (1996). "Proteolysis in cheese during ripening". *Food Rev. Int.*, **12**, (4), 457-509.

Fox, P.F., Stepaniak, L.. (1.993). "Enzymes in Cheese Technology". *Int. Dairy Journal*, **3**:509-530.

Fox, P.F..(1984). "Proteolysis and protein-protein interactions in cheese manufacture." in *Developments in food proteins-3*. Hudson, B.J.F. (Ed.), Elsevier Applied Science Publishers, London, 69-112.

Fox, P.F..(1993). "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.". Vol.1 y 2 .Segunda Edición, London, Chapman and Hall.

Fox, P.F..(1.992). "Indigenous enzymes in milk : proteinases.". *Advanced Dairy Chemistry -1-Proteins*, ed. Fox, P.F., Elsevier Applied Science, London, pp-79-89.

Grappin, R., Rank, T.C., Olson, N.F.. (1.985). "Primary Proteolysis of Cheese Proteins During Ripening . A Review. ". *J. Dairy Sci.*, **68**, (3), 531-540.

Green, J.M..(1.996). "A practical guide to analytical method validation". *Analytical Chemistry News and Features*, **1**: 305-309.

Grieve, P.A., Kitchen, B. J..(1985). "Proteolysis in milk: The significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action of leucocyte, bacteria and natural milk proteinases on caseins". *J.Dairy Res.*, **52** : 101-112.

Grufferty, M.B., Fox, P.F..(1.988a). Review article. "Milk alkaline proteinase". *J. Dairy Res.*,**55**: 609-630.

Grufferty, M.B., Fox, P.F..(1.988b). "Functional properties of casein hydrolysed by alkaline milk proteinase." *N.Z.J. Dairy Sci. Technol.*,**23**: 95-108.

Hayes, K.D., Nielsen, S.S.. (2000). "Plasmin Levels in Fresh Milk Whey and Comercial Whey Protein Products" .*J.Dairy Sci* **83** : 387-394 .

Heegard, C.W., Rasmussen, M.D., Benfeldt, C., Jensen, N.J., Sejrson, K., Petersen, T.E. (1994). "*Plasminogen activators in bovine milk during mastitis, an inflammatory disease*". *Fibrinolysis*, **8**: 22-30.

Hofmann, C.J., Keenan, T.W., Eigel, W.N. (1979). "*Association of plasminogen with bovine milk fat globule membrane*". *Int. Journal of Biochemistry*, **10**: 909-917.

Hynes, E.R., Aparo, L., Candiotti, M.C. (2004). "*Influence of residual milk-clotting enzyme on alfa s1 casein hydrolysis during ripening of Reggianito Argentino Cheese*". *J. Dairy Sci.* **.87**: (en imprenta).

Kaminogawa, S., Yamauchi, K. (1972a). "*Acid protease of bovine milk*". *Agric. Biol. Chem.*, **36**: 2351-2356.

Kaminogawa, S., Yamauchi, K., Miyazawa, S., Koga, Y. (1980). "*Degradation of casein components by acid protease of bovine milk*". *J. Dairy Sci.* **63**: 701-704.

Koning, P.J., Kaper, J., Rollema, H.S., Driessen, F.M. (1985). "*Age-thinning and gelation in unconcentrated UHT-sterilized skim milk. Effect of native milk proteinase*". *Neth. Milk Dairy J.*, **39**: 71-87.

Korycka-Dahl, M., Ribadeau-Dumas, B., Chene, N., Martal, J. (1983). "*Plasmin Activity in Milk*". *J. Dairy Science*, **66**: 704-711.

Lawrence, R.C., Gilles, J., Creamer, L.K. (1983). "*The relationship between cheese texture and flavour*". *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.* **18**: 175-190.

Le Bars, D., Gripon, J.C. (1989). "*Specificity of plasmin towards bovine alfa S2-casein*". *J. Dairy Res.*, **56**, 817-821.

Lu, D.D., Nielsen, S. (1993). "*Assays for native plasminogen activators in bovine milk*". *J. Dairy Sci.* **76**: 3362-3368.

McSweeney, P.L.H., Olson, N.F., Fox, P.F., Healy, A., Højrup, P.. (1993c) .
"Proteolytic specificity of plasmin on bovine α S1- casein". Food Biotechnol., **7**:143-158.

McSweeney, P.L.H., Sousa, M.J.. (1998). "Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening. A review". Oral communication at the Symposium Quality and Microbiology of Traditional and Raw Milk Cheese of the Cost 95 meeting, Dijon, France, 30 Nov.-1 Dec. .

McSweeney,P.L.H., Fox, P.F., Olson, P.F..(1995)."Proteolysis of bovine caseins by cathepsin D: Preliminary observations and comparison with chymosin". Int.DairyJ., **5**:321-336.

Miller, J.C., Miller, J.N.. 1.993. "Estadística para Química Analítica" . Segunda Edición. Addison- Wesley Iberoamericana, EUA.

Noomen, A..(1975). "Proteolytic activity of milk protease in raw and pasteurized cow's milk". Neth. Milk Dairy J., **29**, 153-161.

Olivecrona, T., Vilaró, S., Bengtsson-Olivecrona, G.. (1992). "Indigenous enzymes in milk.II.Lipases in milk. Advanced Dairy Chemistry - 1- Proteins" in Fox, P.F. (Ed.) Elsevier Applied Science, London, 292-310.

Ollikainen, P., Kivela, T..(1.989). "The importance of plasmin in Swiss-type cheese ripening". Milchwissenschaft,**44**,(4), 204-206.

Ollikainen, P., Nyberg, K..(1.988)."A study of plasmin activity during ripening of Swiss-type cheese". Milchwissenschaft, **43**, (8), 497-499.

Pearse, M.J., Lindklater, P.M., Hall, R.J., Mackinlat, A.G..(1986)."Extensive degradation of casein by plasmin does not impede subsequent curd formation and syneresis". J.Dairy Res., **53**: 477-480.

Politis, I., Barbano, D.M., Gorewit, R.C.. (1992). "Distribution of Plasminogen and Plasmin in Fractions of Bovine Milk". J.Dairy Sci **75**: 1402-1410.

Politis, I., Lachance, E., Block, E., Turner, J.D.. (1989). "*Plasmin and plasminogen in bovine milk : a relationship with involution*". J.Dairy Sci. **72** , 900-915.

Politis, I., Ng Kwai Hang, K.F. . (1.989). "*Effects of environmental factors on plasmin activity*". J.Dairy Sci., **72**, 1713-1720.

Politis, I., Ng Kwai Hang, K.F. .(1988). "*Effects of somatic cell count and milk composition on cheese composition and cheese making efficiency*". J.Dairy Sci., **71**:1711-1719.

Politis, I., Zavizion, B., Barbano, D.M., Gorewit, R.C..(1.993). "*Enzymatic assay for the combined determination of plasmin plus plasminogen in milk: revisited*". J.Dairy Sci., **76**: 1260-1267.

Politis, I., White, J.H., Zavizion, B., Goldberg, J.J., Guo, M.R., Kindstedt, P..(1.994). "*Effect of Individual Caseins on Plasminogen Activation by Bovine Urokinase-Type and Tissue-Type Plasminogen activators*". J.Dairy Sci., **78**: 484-490.

Quattrocchi, O. A., Andrizzi, S.I., Laba, R.F..1.992. "*Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica*." Artes Gráficas Farro, 301-328.

Rampilli, M., Raja, V..(1.998). "*Osservazioni sull'attività di plasmina e plasminogeno nel formaggio*". Scienza e Técnica Lattiero Casearia, **49**, (6), 341-350 .

Reimerders, E.H..(1983). "*New aspects of naturally occurring proteases in bovine milk*". J.Dairy Sci., **66**: 1591-1600.

Ribadeau Dumas, B., Mercier, J.C., Grosclaude, F. .(1973). "*Aminoacid composition and sequence of bovine α S1 and β - casins*". Neth Milk Dairy J., **27**: 304-312.

Richardson, B.C., Pearce, K.N.(1.981). "The determination of plasmin in dairy products". N.Z.J.Dairy Sci. Tech., **16**, 209-220.

Rollema, H.S., Poll, J.K.(1986). "The alkaline milk proteinase system: kinetics and mechanism of heat-inactivation". Milchwissenschaft, **41 (9)**: 536-540.

Rollema, H.S., Visser S., Poll, J.K.(1.983). "Spectrophotometric assay of plasmin and plasminogen in bovine milk". Milchwissenschaft, **38**:214-217.

Rollema, H.S., Visser, S., Poll, J.K. . (1983). "On determination, purification and characterization of the alkaline proteinase from bovine milk". Netherlands Milk Dairy J. **35** :396-410.

Schaar, J. . (1985) "Plasmin activity and proteose-peptone content f individual milks.". J.Dairy Res., **52**:369-380.

Schaar, J., Funke, H.(1.986). "Effects of subclinical mastitis on milk plasminogen and plasmin compared with that on sodium, antitrypsin and N-acetyl- β -D-glucosaminidase". J.Dairy Sci. **71**: 505-513.

Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina. (2004). <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/lacteos>.

Segel, Irwin H..1.991. "Enzimas". Cálculos de Bioquímica, ed. Universidad de California, Davis, California, pp. 275-417.

Somers, J.M., Kelly, A.L.(2.002). "Contribution of plasmin to primary proteolysis during ripening of cheese: effects of milk heat treatment and cheese cooking temperature". Lait, **82**: 181-191.

Snoeren, T.H.M., Van Riel JAM. (1979). "Milk proteinase, its isolation and action on α S2 and β - casein", Milchwissenschaft, **34**:528-531.

Stepaniak, L., Jedrychowski, J., Grabska, J., Wróblewska, B., Sfrhaug, T.. (1998). "Application of immunoassays for proteins and peptides in milk and dairy products". Agricultural & Food Chem., **2** :673-687.

Swaigood, H. E.(1992).*"Chemistry of caseins "*in *Advanced Dairy Chemistry-1:Proteins*, P.F.Fox (Ed), Elsevier Applied Science, London, 63-110.

Visser, F.M.W., de Groot-Mostert, A.E.A.. (1977). *"Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 4. Protein breakdown: a gel electrophoretic study"*. N.Z.Milk Dairy J. . **31** : 247-264.

White, J.H., Zavisson, B., O'Hare, K., Gilmore, J., Guo, M.R., Kindstedt, P., Politis I..(1.995).*"Distribution of plasminogen activator in different fractions of bovine milk"*. J.Dairy Res., **62**, 115-122 .

Zalazar, C.A., Meinardi, C.A., Hynes, E.R.. (1999).*"Quesos típicos argentinos. Una revisión general sobre producción y características"*. UNL (Ed.), Argentina.

Zalazar, C.A., Meinardi, C.A., Reinheimer, J.A., Bianchi Salvadori, B., Zamboni, E.F., Sordi, F., Gallino, R.R., Di Berardino, J., Andrich, O.D., Cravero, R.A..1.994. *"Ciencia y Tecnología de los Productos Lácteos"* .Diagramma (Ed.), Argentina.