

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad
Nacional del Litoral para la obtención del grado académico**

Magíster en Ciencias de Alimentos

**RESPUESTA DE LAS PROTEÍNAS DEL SUERO DE
LA LECHE BOVINA A LA ACCIÓN DE DIVERSAS
ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DE USO INDUSTRIAL**

por

Mario César Candiotti

Realizada en el

PROGRAMA DE LACTOLOGÍA INDUSTRIAL

Director: Carlos A. Zalazar

Co-Director: Carlos A. Meinardi

ÍNDICE

ÍNDICE	ii
RESUMEN	1
I- INTRODUCCIÓN.....	5
I.1- GENERALIDADES.....	5
I.2- PROTEÍNAS DE LA LECHE	7
<i>Características generales</i>	7
a- Caseínas	7
b- Sueroproteínas	8
* Albúminas	9
* Globulinas	9
* Fracción Proteosa-Peptonas	9
* Proteínas menores.....	10
Características fisicoquímicas y rol fisiológico de las sueroproteínas	14
a- Albúminas.....	14
* α -lactoalbúmina.....	14
* β -lactoglobulina.....	16
* Seroalbúmina.....	23
b- Globulinas.....	24
c- Fracción Proteosa - Peptonas.....	28
* Componente III (PP-3).....	28
* Componente V (PP-5).....	28
* Componente VIII lento (PP - 8L).....	29
* Componente VIII rápido (PP-8R)	29
d- Proteínas menores.....	29
* Metaloproteínas	30
- Lactoferrina (Lf).....	30
- Transferrina (Tf).....	31
- Ceruleoplasmina.....	31
* Microglobulina β 2 (lactolina).....	32
* Glicoproteína α 1	32
<i>Características funcionales de las sueroproteínas</i>	33
<i>Procesos de recuperación de las sueroproteínas</i>	35
a- Termocoagulación o método tradicional	35
b- Precipitación en frío	35
c- Filtración por gel o tamizado molecular.....	36
d- Adsorción en columna.....	36
e- Ultrafiltración (UF).....	36

f- Hiperfiltración u Osmosis inversa (OI).....	36
g- Deshidratación.....	37
<u>Algunas aplicaciones de las sueroproteínas</u>	39
a- Incorporación a productos alimenticios en general	39
b- Utilización en técnicas de microencapsulamiento.....	40
c- Elaboración de quesos con inclusión de las proteínas del suero	41
* Mejora del rendimiento quesero.....	41
- Procedimiento Centri-Whey.....	41
- Procedimiento por Ultrafiltración (M. M. V.).....	42
* Obtención de quesos con contenido reducido en materia grasa.....	42
* Incidencia de las sueroproteínas en la maduración del queso	43
d- Hidrólisis enzimática de las sueroproteínas	45
* Estado actual de los conocimientos.....	45
* Actividad enzimática inducida	46
* Actividad enzimática inherente al medio al que se incorporan.....	46
I.3- OBJETIVO DEL TRABAJO.....	49
II- MATERIALES Y METODOS	50
II.1- ENSAYOS IN VITRO.....	50
<u>Obtención del sustrato</u>	50
a- Suero proteínas nativas: Suero isoeléctrico	50
b- Suero proteínas parcialmente desnaturalizadas	52
c- Suero proteínas puras.....	54
<u>Enzimas ensayadas</u>	55
a- Enzimas coagulantes puras (patrones).....	55
* Pepsina porcina	55
* Pepsina bovina.....	57
* Renina bovina.....	58
b- Mezclas comerciales de enzimas coagulantes.....	59
* Coagulante de origen animal.....	60
- Cuajo bovino	60
* Coagulantes de origen microbiano.....	60
- Coagulante microbiano MR 90 - A	60
- Coagulante microbiano MR 90 - B	62
- Coagulante microbiano MEITO en polvo.....	62
* Renina producida por fermentación	63
- Renina de Kluyveromyces lactis MAXIREN	63
c- Enzimas proteolíticas comerciales.....	63
* Proteasa líquida de Bacillus subtilis N 8000.....	63
* Proteasa en polvo de Bacillus subtilis N 34500.....	63
* Proteasa en polvo de Aspergillus oryzae 31000.....	63
<u>Hidrólisis de las sueroproteínas</u>	65
a- Hidrólisis del suero isoeléctrico	65

* Condiciones de incubación.....	65
- pH del sustrato.....	65
- Temperatura de incubación.....	66
- Tiempo de incubación.....	66
* Relación enzima/sustrato.....	67
- Cuajo líquido de bovino adulto.....	68
- Pepsina porcina pura.....	69
- Pepsina bovina pura.....	69
- Renina bovina pura.....	70
- Coagulante MR 90 - A.....	70
- Coagulante MR 90 - B.....	71
- Coagulante MEITO.....	71
- Coagulante MAXIREN de Gist Brocades.....	72
- Proteasa líquida de Bacillus subtilis N 8000.....	72
- Proteasa en polvo de Bacillus subtilis N 34500.....	72
- Proteasa en polvo de Aspergillus oryzae 31000.....	73
- Testigo.....	74
b- Hidrólisis de las sueroproteínas parcialmente desnaturalizadas.....	74
c- Hidrólisis de las sueroproteínas puras.....	74
<u>Determinaciones analíticas</u>	76
a- Evaluación cuantitativa.....	76
* Procedimiento.....	77
- Fraccionamiento de nitrógeno.....	77
- Determinación del contenido de nitrógeno.....	80
b- Evaluación cualitativa.....	81
II.2- ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN QUESOS.....	84
<u>Condiciones de trabajo</u>	84
a- Selección del tipo de queso.....	84
b- Elección de la proteasa.....	85
c- Agregado de ricotta.....	85
<u>Elaboración casearia</u>	86
<u>Determinaciones analíticas</u>	88
a- Determinaciones analíticas al tiempo cero (cuajada).....	88
* Estudio electroforético del residuo caseínico insol. a pH 4,6.....	88
* Preparación de la muestra de residuo insoluble a pH 4,6.....	88
b- Determinaciones analíticas sobre el queso maduro.....	89
* Grado de maduración (GM).....	89
* Determinación del contenido de nitrógeno total.....	90
* Determinación del contenido de nitrógeno soluble a pH 4,6.....	90
* Estudio electroforético del residuo caseínico insol. a pH 4,6.....	92
* Determinación del contenido de humedad.....	92
* Rendimiento.....	93
* Evaluación sensorial.....	93

III- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	95
III.1- RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS ENSAYOS IN VITRO.....	95
<u>Ensayos sobre suero isoeléctrico</u>	95
a- Resultados obtenidos para las enzimas coagulantes puras	99
b- Resultados obtenidos para mezclas comerciales de enzimas coagulantes.....	108
c- Resultados obtenidos para las enzimas proteolíticas comerciales.....	116
<u>Ensayos sobre sueroproteínas parcialmente desnaturalizadas</u>	121
<u>Ensayos sobre sueroproteínas puras</u>	133
a- Hidrólisis producida sobre α -lactoalbúmina pura.....	133
b- Hidrólisis producida sobre β -lactoglobulina pura	136
III.2- RESULTADOS CORRESPONDIENTES A ELABORACIONES DE QUESOS A ESCALA PILOTO.....	140
<u>Implicancias de la presencia de ricotta en el queso</u>	140
a- Implicancia tecnológica: Influencia en el tiempo de coagulación.....	140
b- Incidencia en las características físicoquímicos del producto.....	141
<u>Actividad hidrolítica en los quesos</u>	143
<u>Resultado de la evaluación sensorial</u>	148
IV- CONCLUSIONES	151
ANEXO I	157
ANEXO II	159
V- BIBLIOGRAFÍA.....	161

RESUMEN

El suero de quesería constituye una abundante y económica fuente de proteínas cuyo óptimo valor nutritivo y excelentes propiedades funcionales, hacen que su incorporación en diversos alimentos sea una práctica cada vez más frecuente.

En muchas de estas aplicaciones, resulta fundamental conocer la respuesta de las sueroproteínas frente a los distintos sistemas enzimáticos existentes en el medio al que se incorporan. Tal es el caso de los quesos con proteínas de suero, puesto que la presencia de éstas, según su resistencia a la proteólisis, puede alterar el proceso de maduración y las características del producto final.

El presente estudio se orientó hacia la obtención de datos, a través de ensayos *in vitro*, de la susceptibilidad de las sueroproteínas a la acción de diversos agentes coagulantes, bajo condiciones que simulen las de un queso.

Se trabaja con sueroproteínas nativas (suero isoelectrico), sueroproteínas parcialmente desnaturizadas (Dairy Lo[®]) y con sueroproteínas mayoritarias puras (α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina).

Se ensayaron los siguientes sistemas enzimáticos: tres enzimas coagulantes puras (pepsina porcina, pepsina bovina y renina bovina); cinco mezclas comerciales de enzimas coagulantes (un coagulante de bovino adulto, tres coagulantes de diverso origen microbiano y una renina producida por

fermentación y tres enzimas proteolíticas comerciales (dos de origen bacteriano y una de origen fúngico).

Como condiciones de trabajo se establecieron: temperatura de incubación 37°C; tiempo de incubación 48 horas y pH del sustrato 5,4.

Para la relación enzima/sustrato, se tomó como referencia el cuajo líquido de bovino adulto, al triple de la concentración normalmente empleada en la elaboración de quesos, a fin de lograr el mayor grado de hidrólisis posible. Esto correspondió a 0,08 ml para los 200 ml de sustrato usados en la experiencia. Las demás enzimas se calcularon manteniendo la misma actividad coagulante (igual título).

Al final de la incubación se determinaron los incrementos relativos porcentuales producidos en las siguientes fracciones nitrogenadas: nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 2% y al 12% y en ácido fosfotúngstico, conjuntamente con un análisis electroforético.

Finalmente se realizó un ensayo caseario, en el que se elaboraron tres quesos cremosos: uno testigo, uno agregando el 4,5% de ricotta semimagra y otro ídem, más la proteasa N 34500, seleccionada en base a la experiencia anterior.

Los tres quesos fueron analizados electroforéticamente al tiempo cero. A los 20 días de maduración además de la electroforesis, se determinó el contenido de humedad, grado de maduración, rendimiento, completando el análisis con una evaluación sensorial.

Los resultados de los ensayos in vitro, muestran que las enzimas coagulantes puras tuvieron una escasa actividad proteolítica sobre las sueroproteínas nativas, orientada fundamentalmente hacia la α -lactoalbúmina. La renina bovina, fue prácticamente inactiva, siendo su acción semejante a la del testigo.

Las mezclas coagulantes comerciales de origen fúngico fueron las de mayor actividad, con una acción dirigida principalmente hacia la β -lactoglobulina. La renina producida por fermentación se comportó prácticamente igual a la renina bovina.

Las enzimas proteolíticas comerciales exhibieron un nivel de hidrólisis comparable al de los coagulantes comerciales. Con perfiles muy diferentes atacaron tanto a la α -lactoalbúmina, como la β -lactoglobulina.

Los ensayos sobre sueroproteínas parcialmente desnaturalizadas, revelaron importantes cambios tanto en la intensidad, como en los perfiles de las cuatro enzimas estudiadas.

El estudio electroforético correspondiente a las experiencias con α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina puras confirmaron la selectividad cualitativa advertida en los ensayos anteriores.

Finalmente, con respecto al ensayo caseario, se pudo comprobar que la actividad de la proteasa N 34500 hacia las sueroproteínas desnaturalizadas, se verifica también en el ambiente propio de un queso. Este hecho, abriría la posibilidad de incrementar la proporción de ricotta adicionada sin perjuicio de la

calidad del queso, o bien acelerar su proceso de maduración, dado que esta enzima también resultó sensiblemente activa hacia las caseínas.

I- INTRODUCCIÓN

I.1- GENERALIDADES

Del total de la leche producida en el mundo, aproximadamente la mitad es destinada a la elaboración de distintos tipos de quesos (1). En estos productos se recupera una buena cantidad de la materia grasa y prácticamente un 80% de las proteínas totales contenidas en la materia prima. El restante 20% de las proteínas son fundamentalmente las llamadas proteínas del suero ó sueroproteínas. Estas proteínas permanecen casi en su totalidad en el suero, el cual en gran parte no recibe un adecuado tratamiento que permita recuperarlas y utilizarlas en la amplia gama potencial de aplicaciones que tienen.

Sin embargo, teniendo en cuenta tanto su óptimo valor nutritivo como sus interesantes propiedades funcionales, actualmente son muchos los caminos que se intentan para su recuperación. Esta tendencia encuentra también un fuerte incentivo en el hecho de no destinar el suero de quesería a efluentes ya que posee una elevada demanda biológica de oxígeno y por ello antes de ser descartado se lo debe someter a costosos tratamientos.

Una vez recuperadas, las proteínas de suero pueden ser sometidas a distintos tratamientos que mejoren sus propiedades. Uno de estos tratamientos es la hidrólisis enzimática.

En el presente trabajo se plantea la obtención de datos sobre este proceso de hidrólisis, con el fin de aportar información de utilidad que favorezcan los

procesos tecnológicos que tienden a obtener, a partir de las proteínas del suero, productos con aplicaciones cada vez más interesantes.

Como primer paso para el logro de este objetivo se plantea una rápida revisión de la química de las proteínas de suero, de sus características funcionales, de los procesos para su recuperación y de alguna de sus aplicaciones, poniendo especial énfasis en aquellas que implican la hidrólisis enzimática. El segundo paso está dedicado totalmente a la parte experimental.

I.2- PROTEÍNAS DE LA LECHE

Características generales

Las sustancias nitrogenadas halladas en la leche, son muy numerosas y variadas, lo cual las convierte en su fracción más compleja. Dentro de este grupo, las proteínas revisten el mayor interés, no solo desde el punto de vista nutritivo, sino también por estar relacionadas con las propiedades fisicoquímicas más importantes de la leche, especialmente su estabilidad.

La leche de vaca contiene normalmente entre 3,0 y 3,5% de proteínas, las que representan aproximadamente el 95% del nitrógeno total.

Las proteínas de la leche se dividen en dos fracciones principales: **caseínas y proteínas del suero o sueroproteínas.**

a- Caseínas

La **caseína entera** es un complejo de proteínas fosforadas que constituye la parte nitrogenada más característica de la leche, dado que no existe ninguna sustancia parecida ni en la sangre ni en los tejidos de los mamíferos. Está integrada por las caseínas α 1 (36%), α 2 (10%), β (34%), κ (13%) y los **residuos γ 1, γ 2, γ 3** (7%), las cuales contienen del 76 al 80% del nitrógeno total de la leche (2).

Estas caseínas, en presencia de iones calcio, se asocian espontáneamente de un modo muy especial que conduce a la formación de partículas complejas conocidas como micelas. Esto constituye la esencia del estado micelar de la caseína nativa, la cual se encuentra en forma partículas aproximadamente esféricas dispersas en la fase acuosa de la leche, con tamaños muy heterogéneos, en el orden de 10 a 10^2 nm (3).

Las caseínas se distinguen de las demás proteínas de la leche por el hecho de coagular bajo la acción del cuajo o de una acidificación a pH próximo a 4,6, por lo que a la caseína entera también se la ha denominado “**proteína insoluble**”.

El adecuado conocimiento del estado micelar de la caseína, constituye la base de las tecnologías que tienen por objetivo desestabilizar esta fase de la leche.

b- Sueroproteínas

Las proteínas del suero de leche han sido definidas como “**La compleja fracción de sustancias no dializables contenidas en el suero que se obtiene tras la precipitación de la caseína a pH 4,6**”. De allí que también se las conoce como **proteínas solubles** (2).

Estas proteínas constituyen un grupo mucho más heterogéneo que el de las caseínas, tanto desde el punto de vista de su origen, como desde el de su composición.

Su tenor puede variar sensiblemente según la especie; por ejemplo, en la leche de los rumiantes, las sueroproteínas representan entre un 17 y un 20% de las materias nitrogenadas, mientras que en los mamíferos monogástricos, como en el caso de la leche humana, esta proporción se eleva notablemente, pudiendo llegar hasta un 50%. No obstante, en este caso, el valor absoluto es el mismo, o sea aproximadamente unos 6 gr/lt.

A través de la diferencia de solubilidad que exhiben las proteínas del suero cuando se las expone a agentes precipitantes tales como sulfato de sodio (12 y 20%), ácido tricloroacético ó sulfato de amonio (semisaturación), se pueden distinguir cuatro grandes grupos:

*** Albúminas**

Es cuantitativamente la fracción más importante, pues representa el 75% de las proteínas del suero lácteo, y el 15% de las proteínas de la leche. Está compuesta fundamentalmente por tres tipos de proteínas: **α -lactoalbúmina (α -la)** 25%, **β -lactoglobulina (β -lg)** 75% y **seroalbúmina bovina (BSA)** 5%.

*** Globulinas**

Corresponde al grupo de las **Inmunoglobulinas (Ig)**, las cuales representan entre el 10 y el 12% de las proteínas solubles.

*** Fracción Proteosa-Peptonas**

Es una fracción muy heterogénea, que representa aproximadamente el 10% de las sueroproteínas. Comprende fundamentalmente cuatro componentes, denominados **componentes III (PP-3), V (PP-5), VIII lento (PP-8L) y VIII rápido (PP-8R)**. Sin embargo, en el caso de los **componentes PP-5, PP-8L y PP-8R** no se trata de proteínas originales, dado que éstos son el resultado de la acción hidrolítica de la plasmina sobre la **β -caseína**.

*** Proteínas menores**

Agrupar un cierto número de proteínas que se encuentran en la leche en pequeña proporción, y son difíciles de clasificar. Entre ellas se destacan las **metaloproteínas: lactoferrina, transferrina y ceruleoplasmina; microglobulina β 2 (o lactolina) y glicoproteína α 1**. En conjunto representan menos del 5% de las proteínas del suero lácteo.

En la Tabla I se puede apreciar su distribución media, basada en el método e fraccionamiento de Aschaffenburg y Drewry (1959), y el origen de cada fracción (4).

Tabla I- Origen y distribución media de las proteínas de la leche

Proteínas (95% de las sustancias nitrogenadas totales de la leche)	Distribución		Origen
	En % de proteínas totales	En grs. por litro de leche	
Caseínas	80	26	mamario
Proteínas del suero lácteo:			
Inmunoglobulinas	2	0,7	sanguíneo
Albúminas	15	4,5	-
β -lactoglobulina	-	-	mamario
α -lactoalbúmina	-	-	mamario
Seroalbúmina	-	-	sanguíneo
Proteosas-peptonas	2	0,5	-
Proteínas menores	1	0,3	-

En la Tabla II, se pueden apreciar algunas características de las principales proteínas de la leche (5).

Tabla II- Algunas características de las principales proteínas de la leche

Proteína	Contribución en peso (gr/lit de leche)	Peso molecular (Daltons)	Contribución numérica (partículas/lit) $\times 10^{17}$	Punto isoeléctrico
Micelas de caseína	26	10^8	~ 1	4,6
β -lactoalbúmina (β -lg)	3,0	18400	1000	5,2
α -lactoalbúmina (α -lg)	1,2	14200	500	5,1
Seroalbúmina bovina (BSA)	0,3	69000	26	4,8
Inmunoglobulinas (Ig G)	0,5	160000	15	5,5 - 6,8

En base a estos datos, puede verse que si bien la relación de pesos entre las micelas de caseína y las moléculas de proteínas mayoritarias del suero (β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina) es cercana a 6, éste resulta un valor pequeño comparado con la relación entre el número de moléculas de sueroproteínas/litro y el número de micelas de caseína, que es aproximadamente 1500. El número de partículas reviste gran importancia en los tratamientos térmicos, puesto que está fuertemente correlacionado tanto con la cinética de los mismos, como con la superficie específica de las proteínas. Por otro lado, un mayor número de partículas, implica mayor número de individuos desnaturalizados y por ende, serán mayores las interacciones que de ellos puedan derivar, como por ejemplo

el depósito de sueroproteínas sobre las micelas de caseína durante el calentamiento de la leche.

Características fisicoquímicas y rol fisiológico de las suero proteínas

a- Albúminas

*** α -lactoalbúmina**

Es el componente más característico del lactosuero, pues parece estar presente en la leche de todos los mamíferos. Representa cerca del 25% de la fracción **albúminas**.

Esta proteína tiene un peso molecular 16300, y está constituida por 123 aminoácidos cuya secuencia se muestra en la Figura 1 (2).

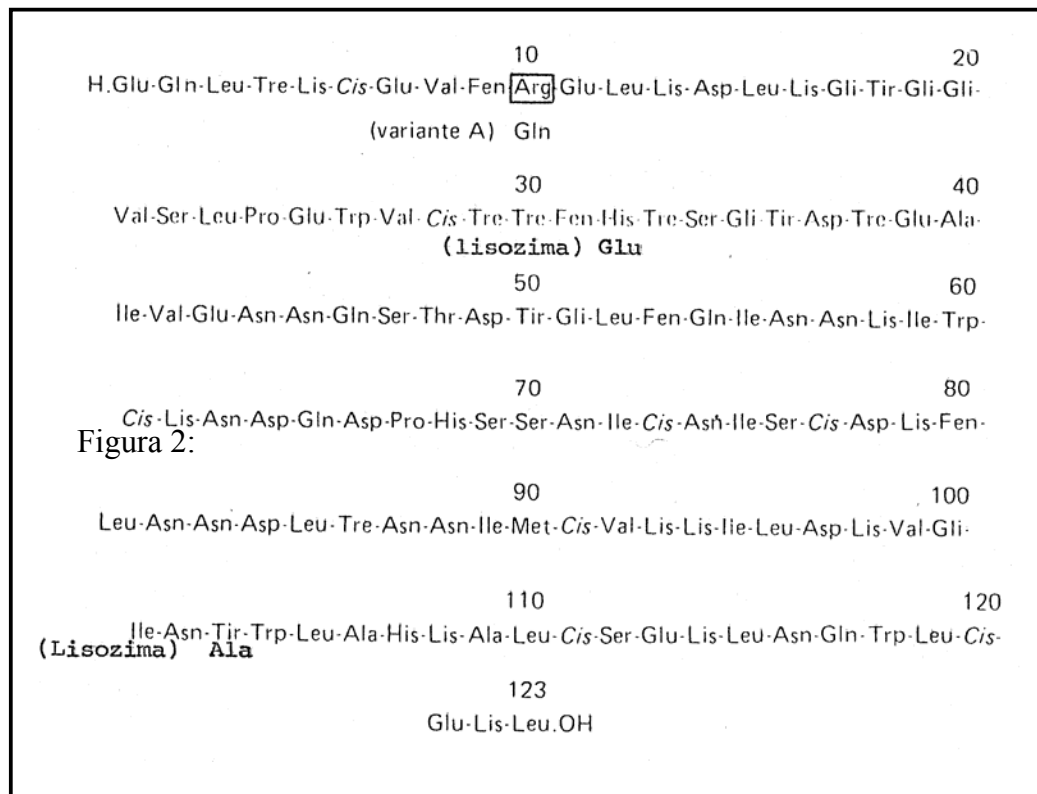
Es considerablemente rica en triptofano, dado que contiene 4 restos por mol (aproximadamente el 6%).

Su estructura globular y compacta, está reforzada por la existencia de cuatro puentes disulfuro, entre los aminoácidos: 6 - 120; 28 - 111; 61 - 77 y 73 - 91. Dentro de esta estructura, se pueden distinguir cuatro regiones de α -Hélice, cinco de 310 Hélice y dos de Lámina β antiparalela (6).

Normalmente contiene un átomo de Ca^{+2} , estrechamente ligado, por molécula, aunque también puede unirse a otros iones como Mn^{+2} .

Su solubilidad en agua es elevada a pH 6,0, pero disminuye sensiblemente en la zona de pH 4,0 - 4,6.

Figura 1: Estructura primaria de la α -lacoalbúmina B bovina



Se conocen dos variantes genéticas: **A** y **B**, aunque en las razas bovinas europeas no se encuentra más que la **B**. La variación estriba solo en el aminoácido 10: glicina para **A**, y arginina para **B**.

Por otro lado, a pesar de que la **α -la** no contiene grupos -SH libres, lo cual le impediría ligarse a otras proteínas a través de puentes disulfuro, se admite que puede participar en la formación de complejos con la **κ caseína**, lo que estaría implicando una modificación estructural.

En cuanto al papel biológico de la **α -lactoalbúmina**, se sabe que interviene en la biosíntesis de la lactosa, adsorbiéndose a la **galactosiltransferasa**, para juntas transferir galactosa sobre glucosa (6).

* **β -lactoglobulina**

Es una proteína propia de la leche de los rumiantes, por lo que no se la encuentra en la leche humana. Este hecho la ha sindicado como la principal responsable de la alergia a la leche bovina.

El término **β -lactoglobulina**, es el resultado de circunstancias históricas. S. G. Hambling et al. (7), indican que fue Pedersen, en 1933, el primero en utilizar el prefijo **β** para designar a una proteína en el diagrama de sedimentación obtenido por ultracentrifugación de la leche descremada. A su vez, el prefijo **β** servía para distinguir esta proteína soluble en una solución semisaturada de sulfato de amonio de la fracción insoluble en dicha solución, llamada entonces lactoglobulina. Este carácter de solubilidad sería la explicación de la clasificación

de la **β -lactoglobulina** dentro de la fracción albúmina, aunque su nombre sugiera hacerlo dentro de la fracción globulinas.

Es la sueroproteína más abundante de la leche de vaca, representando aproximadamente el 75% de la fracción albúminas. Su peso molecular es cercano a 18000, aunque en la zona de pH 3 - 7, se encuentra un dímero poco disociado que justifica el valor de un PM de 36000.

En la Figura 2a (2), se puede observar la estructura primaria de la **β -lactoglobulina**.

Es una molécula formada por una sola cadena proteica de 162 aminoácidos, la cual se encuentra fuertemente plegada sobre si misma, manteniendo asegurada su estructura terciaria mediante dos puentes disulfuro, que involucran los aminoácidos 66-160 y 106-119 ó 106-121, quedando un grupo -SH libre distribuido en partes iguales entre las cisteínas 119 y 121 .

En la Figura 2b (8), se indica la distribución de las cargas a pH 6-7 y la localización de los restos de prolina y cisteína, para la **β -lactoglobulina** y para la **α -lactoalbúmina**.

Figura 2a: Estructura primaria de la β -lactoglobulina A bovina

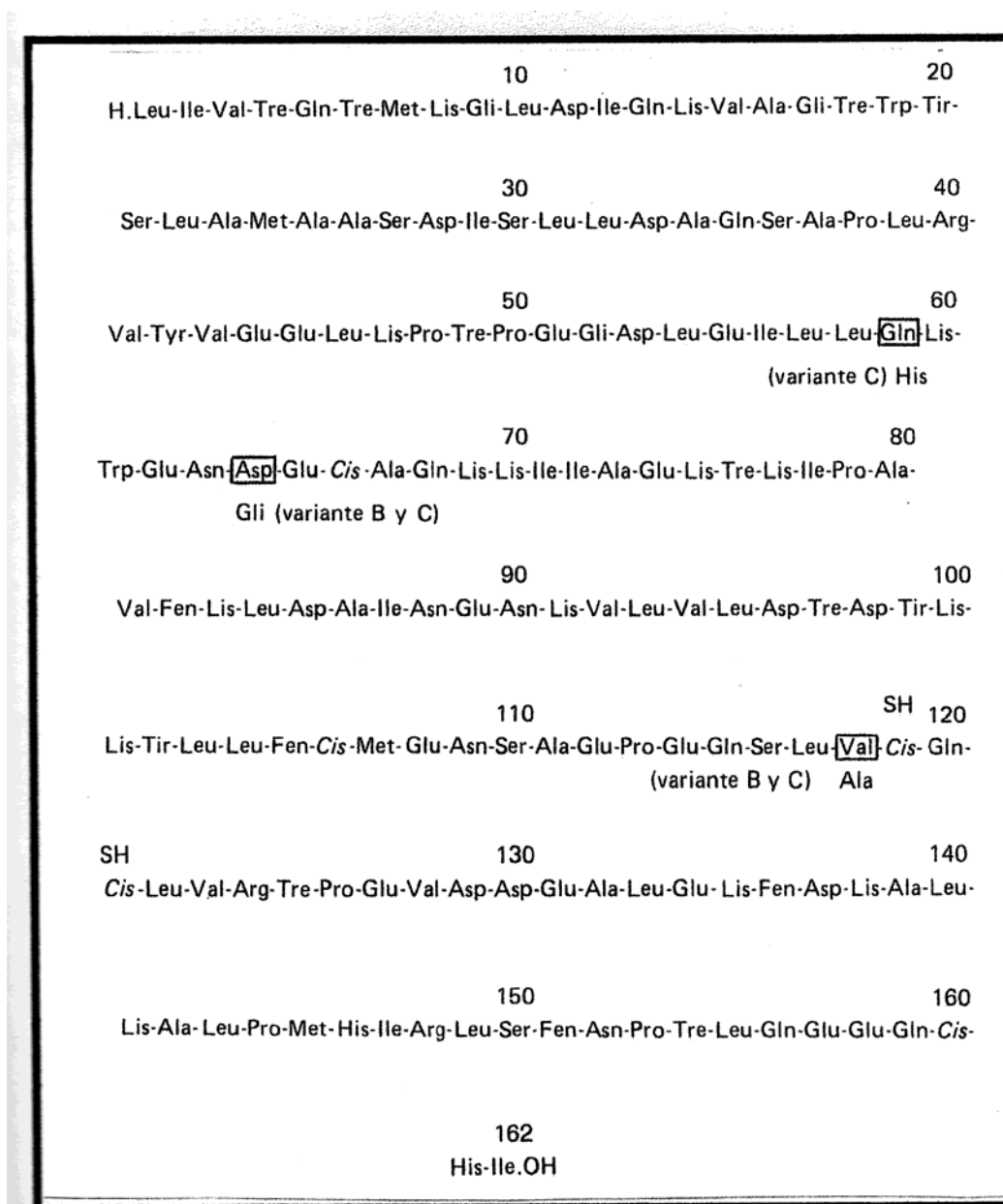
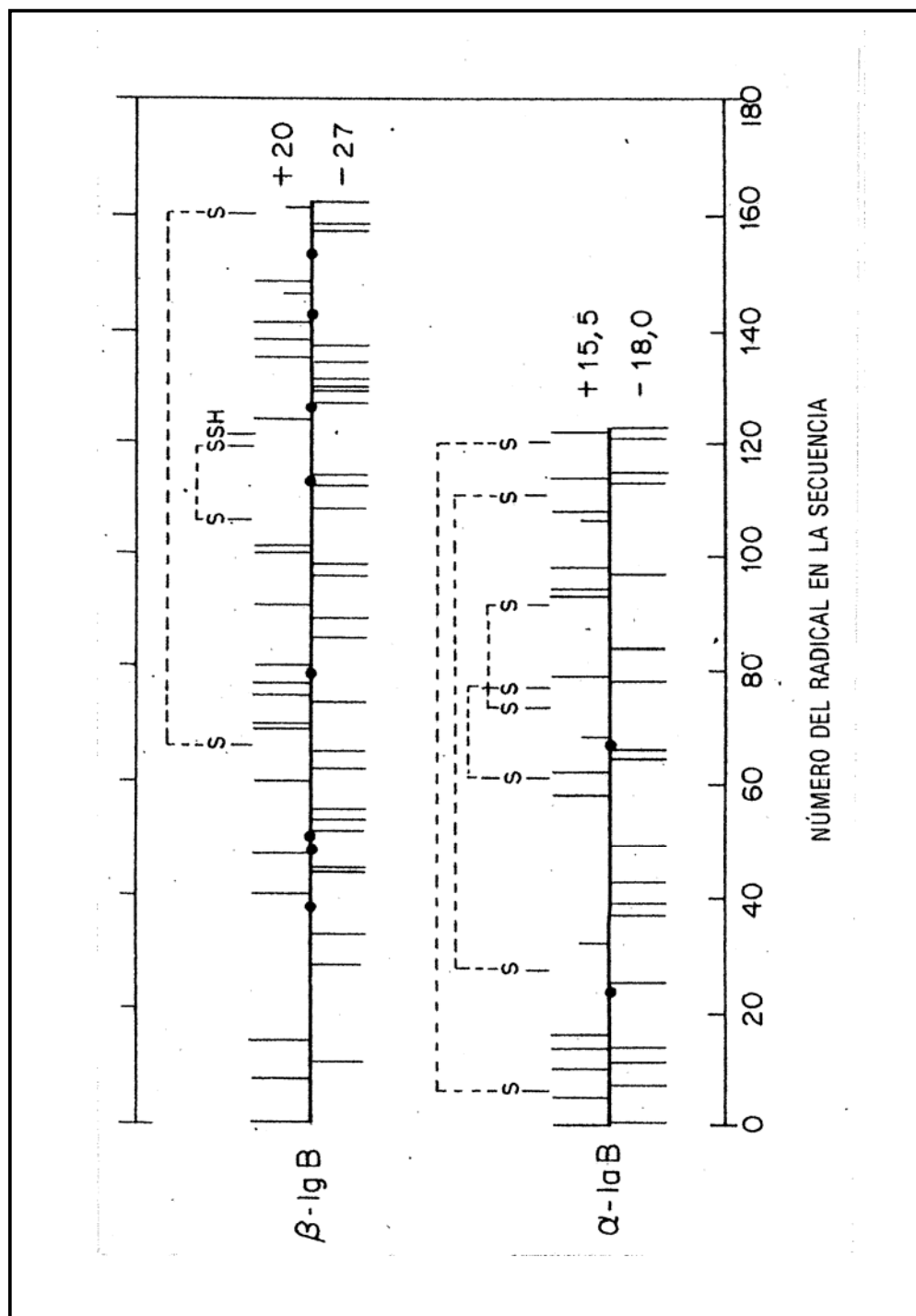


Figura 2b: Situación de los grupos cargados (pH 6-7) y localización de los restos de prolina (●) y cisteína (S) en la β -lactoglobulina y en la α -lactoalbúmina



Si bien estructura secundaria de la β -lg está más regularmente organizada que la de las caseínas, no existen datos precisos al respecto. Mediante estudios cristalográficos a través de espectroscopía Raman ó láser Raman, se ha encontrado que puede tener entre un 7 y 20% de α -hélice, correspondiente a tres vueltas, entre un 43 y 51% de estructura antiparalela repartida en nueve tramos de lámina β , y el resto desordenado (7). Sin embargo, estos valores pueden variar ampliamente a pH extremos o según las características del solvente.

Asimismo, a través del estudio de cristales de β -lg, obtenidos bajo distintas condiciones, se ha podido confirmar su naturaleza dimérica, siendo ésta la forma en que se encuentra naturalmente en la leche. Las subunidades monoméricas, que componen dicho dímero se encuentran asociadas a través de interacciones hidrofóbicas, que involucran los residuos Ile-29, Ile-147 y His-146 (7).

La β -lactoglobulina, es una proteína relativamente rica en cisteína, siendo la principal fuente de grupos -SH (posee cinco restos de cisteína por mol) juntamente con las proteínas del glóbulo graso, aunque la importancia ponderal de éstas no es comparable.

Se conocen cuatro variantes genéticas de la β -lg de la leche de vaca: A, B, C y D, aunque algunos investigadores han encontrado una nueva variante, a la que llamaron H. Esta variante exhibe mayor velocidad electroforética que la A en gel de almidón (9). No obstante, las más frecuentes son las variantes A y B.

Estas variantes genéticas muestran ciertas diferencias en sus propiedades fisicoquímicas, como por ejemplo la mayor solubilidad en agua de la variante B. Asimismo, se ha encontrado que la variante A se octameriza fácilmente entre pH 4 y 5, la B difícilmente y la C nada. A este respecto, se ha sugerido que posiblemente el ácido aspártico suplementario en la variante A cumpla un importante rol como centro activo en la polimerización, dado que un bloqueo específico de los carboxilos inhibe la formación del octámero a pH 4,65.

Por otro lado, también se ha sugerido una relación entre la variante genética de esta proteína y la cantidad total de caseína producida, habiéndose encontrado que es mayor para el genotipo A que para el B.

En las grandes razas bovinas, se ha descubierto, aunque en escasa proporción, un derivado glicosado de la β -Ig, que posiblemente esté constituido por una cadena de nueve restos glucosídicos ligados a la aspargina (2).

Es importante destacar que esta variación en la composición aumenta la solubilidad de la proteína y retarda la proteólisis enzimática.

La β -Ig es capaz de unirse a moléculas hidrofóbicas tales como el retinol (10), o ciertos ácidos grasos como el palmítico, lo que le confiere una mayor resistencia a la hidrólisis trípica in vitro (11). De esto deriva una de sus funciones, la cual consiste en ligar retinol y transportarlo a través del estómago al intestino delgado, protegiéndolo de la oxidación. Es probable que la resistencia de la β -Ig a la digestión gástrica, esté vinculada a esta función (7).

A su vez, a través de sus 26 grupos carboxilo, puede esterificarse con metanol o etanol, lo cual le genera nuevos sitios de ataque en la hidrólisis trípica (12).

Por otro lado, se ha demostrado que la β -lg resulta inhibidora de la actividad de la plasmina, tanto en forma nativa, como desnaturalizada por calor (13-14), lo cual provee evidencia adicional de su rol como regulador de la actividad enzimática en la glándula mamaria.

Además, otros estudios han demostrado que la β -lg también tiene la capacidad de inhibir la actividad fosfatásica (inhibe fosfoproteínas fosfatasa, incluyendo la fosfatasa alcalina mamaria), dependiendo de la presencia de acetatos, iones calcio y de la variante genética. Esta propiedad, permite suponer que esta proteína posiblemente ejerza un efecto regulador sobre el metabolismo de los fosfatos de la glándula mamaria (14).

Desde el punto de vista tecnológico, puede decirse que el comportamiento de la β -lg frente a los tratamientos térmicos, es el origen de ciertos fenómenos que son de gran importancia. En efecto, siendo la β -lg el principal portador de los grupos -SH que se activan en el curso de una desnaturalización por calor, se encuentra estrechamente vinculada a los efectos que derivan de este suceso. Por ejemplo, se sabe que la activación de los grupos sulfhidrilo en una leche tratada térmicamente (a más de 73°C), contribuye a la formación del sabor a cocido, produciendo a su vez una reducción del potencial de óxido reducción, lo cual le confiere cierta resistencia a la oxidación (15).

Sin embargo, es en el aspecto caseario en el que pueden producirse los mayores inconvenientes, dado que una leche tratada térmicamente por encima de la temperatura de pasteurización, forma un complejo con la **κ -caseína** a través de un puente disulfuro, que es más estable que los componentes separados. Este complejo, además de interferir en el proceso de coagulación enzimática de la leche, también altera la fuerza y la sinéresis del gel obtenido (5), (16).

*** Seroalbúmina**

Representa aproximadamente del 5 al 6% de la fracción albúminas.

Es idéntica a la seroalbúmina sanguínea (sintetizada en el hígado); posee la misma composición aminoacídica, el mismo PM (69000), las mismas propiedades electroforéticas y magnéticas y la misma cinética de desnaturalización térmica.

Es muy soluble en agua. Si bien su estructura no está suficientemente aclarada, se sabe que está formada por una única cadena polipeptídica de 582 restos de aminoácidos, con numerosos pliegues estabilizados por 17 puentes disulfuro, conservando un grupo tiol libre en Cis.-34 (8). La seroalbúmina puede ligarse reversiblemente a sustancias muy variadas, en especial a moléculas pequeñas (por ejemplo ácidos grasos), con las que funciona como transportador.

b- Globulinas

Las globulinas de la leche son las responsables de la transmisión de inmunidad y presentan grandes analogías con las inmunoglobulinas (**Ig**) del suero sanguíneo. Son anticuerpos sintetizados en respuesta al estímulo de antígenos macromoleculares extraños al animal. Poseen las importantes propiedades inmunológicas de las gamma-globulinas, las que representan una reunión de anticuerpos.

Una leche normal contiene muy baja cantidad de globulinas, por ejemplo, en la leche de vaca existe un promedio de 0,6 gr/l, lo que representa el 10% de las sueroproteínas, o sea escasamente el 2% de las proteínas totales. Por el contrario abundan en el calostro, ya que éste puede contener hasta 12 gr/l el primer día (80 gr/l la primera hora), pero este valor desciende rápidamente en los días siguientes al parto (2).

Son proteínas conjugadas, con un grupo prostético glucídico. Su peso molecular es próximo a 160000. Son las mayores moléculas que se encuentran en la leche y entre las proteínas, son las menos cargadas y más lentas en los análisis electroforéticos. Asimismo, son las más termosensibles, dado que son las primeras en desnaturalizarse durante el calentamiento de la leche.

La fracción globulinas precipita en una solución semisaturada de sulfato de amonio, a diferencia de la fracción albúminas, que permanece soluble.

Las principales inmunoglobulinas son: las de **clase G (IgG1 e IgG2)**, las de **clase A (IgA)** y las de **clase M (IgM)**.

Todas las inmunoglobulinas tienen una estructura básica similar, la cual está compuesta por cuatro subunidades. Tomando como ejemplo las **IgG**, la molécula intacta contiene dos cadenas livianas idénticas llamadas L, con un PM de 25000 cada una, y dos cadenas pesadas, también idénticas, llamadas H, con un PM de aproximadamente 55000 cada una, lo que totaliza un peso molecular de 160000.

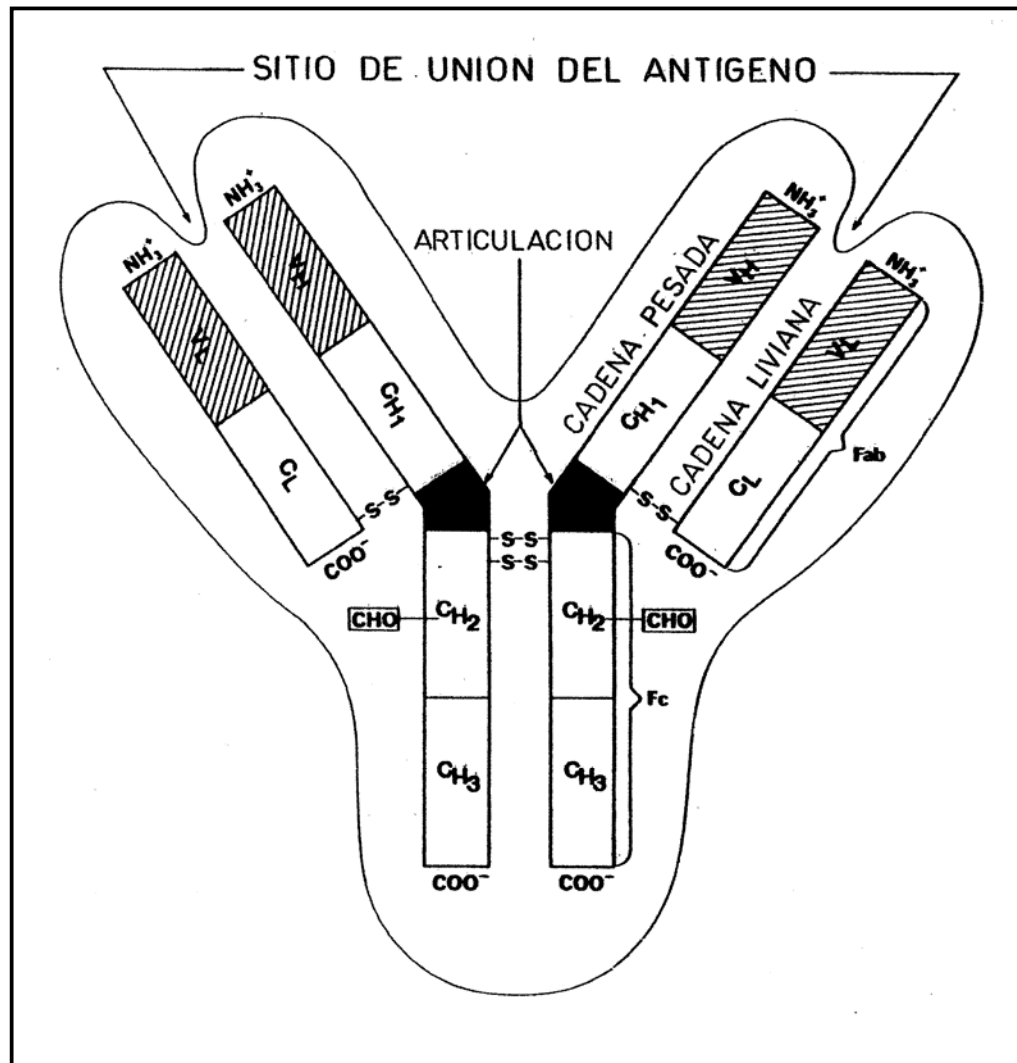
Tanto las cadenas livianas, como las pesadas, poseen una región constante CL y CH y una región variable, asociada a la inmunidad específica, VL y VH respectivamente.

La disposición de estas cadenas, se puede apreciar en el esquema de la Figura 3 (17).

Cada cadena liviana está unida a la cadena pesada por un puente disulfuro y las dos cadenas pesadas se mantienen unidas por dos puentes disulfuro cercanos a la articulación o pivote, que es quien confiere a esta compleja molécula, la flexibilidad conformacional necesaria para las interacciones antígeno-anticuerpo.

Los subíndices 1,2 y 3 se refieren a las tres regiones constantes de las cadenas pesadas CH1, CH2 y CH3 respectivamente.

Figura 3: Diagrama esquemático de la estructura básica de la molécula de Inmunoglobulinas



La región superior de la molécula (Fab en el esquema) es la dominante, y provee dos sitios donde puede ocurrir la unión entre el antígeno y el anticuerpo.

La región inferior Fc contiene las regiones constantes CH₂ y CH₃, donde se encuentran localizados grupos carbohidrato (-CHO en el esquema) tales como glucosa, manosa, hexosaminas y ác. siálico, en distintas proporciones según la clase.

Dado que la unión entre las cadenas es a través de puentes disulfuro, cuando la molécula se trata con un agente reductor como el β-mercaptoetanol, estas uniones se rompen, produciendo la separación de las cadenas livianas y pesadas en forma individual.

Las inmunoglobulinas de la leche ejercen una acción antimicrobiana, sobre todo la **IgM**, que actúa, por ejemplo, como aglutinina frente a ciertos estreptococos. La leche de vaca (no de búfala, cabra u oveja) contiene una **crioglobulina** formada principalmente por **Inmunoglobulinas M**, que interviene en la aglutinación por frío de los glóbulos grasos y en la adhesión de éstos a las bacterias.

Si bien, en general, se ha admitido el origen sanguíneo de las inmunoglobulinas, hoy se sabe que parte de ellas puede sintetizarse en la glándula mamaria.

c- Fracción Proteosa - Peptonas

Es la parte no dializable del lactosuero isoelectrico procedente de la leche calentada a 95°C durante 30 minutos.

Se trata de una fracción pequeña (0,6 gr/lit) y compleja, que ha sido estudiada principalmente en leche de vaca. Esta fracción, que se manifiesta en numerosas bandas en los análisis electroforéticos, es incluida en las sueroproteínas por que precipita en gran parte en ácido TCA al 12%. Sin embargo, este grupo de proteínas, se distinguen del resto de las anteriores por no precipitar mediante un calentamiento a 95-100°C durante 30 min., y además por que muchas de ellas son restos de caseínas.

A su vez, también presentan diferencias desde el punto de vista composicional, dado que algunas poseen glúcidos en notables proporciones y fósforo.

Los componentes dominantes son cuatro:

*** Componente III (PP-3)**

Es una glicoproteína (probablemente idéntica a la existente en la membrana de los glóbulos grasos), que solo se encuentra en el lactosuero. Su parte prostética contiene de 16 a 17% de glúcidos, de los cuales un 7% son hexosas, un 6% hexosaminas, y el resto ác. siálico. Además contiene fósforo en baja proporción (aproximadamente 0,5%). Tiene un peso molecular de aproximadamente 22000, pero se polimeriza fácilmente.

*** Componente V (PP-5)**

Es el fragmento 1-105 de la **β -caseína**, cuyo complemento corresponde al residuo **γ 2**. Su PM es 16000.

*** Componente VIII lento (PP - 8L)**

Es el fragmento 29-107 de la **β -caseína**, cuyo complemento corresponde al residuo **γ 3**. Su PM es 9000.

*** Componente VIII rápido (PP-8R)**

Es el fragmento 1-28 de la **β -caseína**, cuyo complemento corresponde al residuo **γ 1**. Su PM es 3600.

Los componentes **V**, **VIII lento** y **VIII rápido**, no son pues proteínas originales. Si bien antiguamente se supuso que se trataba de restos de proteínas en vía de síntesis que no han completado su formación, hoy se sabe que son el resultado de una hidrólisis de la **β -caseína** debida fundamentalmente a las acción de la plasmina (13). Una parte de estas sustancia se encuentra libre en el lactosuero y otra parte asociada a la caseína.

d- Proteínas menores

Agrupar un cierto número de proteínas que se encuentran en el lactosuero en muy pequeña cantidad, y son difíciles de clasificar. Representan menos del

5% de las sueroproteínas. Se pueden diferenciar: **metaloproteínas**, **microglobulina β_2** ó **lactolina** y **glicoproteína α_1** .

*** Metaloproteínas**

A este grupo corresponden las proteínas del lactosuero que fijan específicamente Fe y Cu, haciendo intervenir puntos de fijación con una elevada constante de asociación. La estabilidad del enlace metal-proteína es bastante grande, pero sin embargo es reversible. Es de destacar que la presencia de hierro en la molécula, hace a estas proteínas más resistentes a tratamientos desnaturalizantes como calor o sustancias químicas, y a la proteólisis enzimática. Se distinguen:

– Lactoferrina (Lf)

La leche contiene como término medio un 0,1% de lactoferrina. Es segregada no sólo por la glándula mamaria, sino también por las mucosas lacrimal, salivar, bronquial y renal. Es una proteína constituida por una única cadena polipeptídica (600 a 700 radicales) de peso molecular 88000. Contiene un 5% de cisteína, y un 7,2% de glúcidos (se une covalentemente a un carbohidrato formado por N-acetilglucosamina, manosa, glucosa y ác. N-acetilneuramínico) (8) lo que le confiere una gran solubilidad. Fija dos átomos de hierro por molécula (lo que implica un contenido del 0,11% en Fe), en forma reversible y

fuertemente dependiente del pH y de la presencia de iones carbónicos. Precipita con la caseína isoeléctrica, a la cual se adsorbe (4).

Esta proteína además de su función biológica de introducir el hierro de la sangre en la leche, posee importantes propiedades bacteriostáticas (privando de Fe a las bacterias) e inmunológicas, lo cual la ha hecho objeto de numerosos estudios (18-19).

– **Transferrina (Tf)**

Procede de la sangre y en la leche de vaca se encuentra en cantidad casi igual a la anterior. Esta proteína, al igual que la **Lf**, consiste en una larga cadena polipeptídica constituida por 600 a 700 radicales, con un peso molecular algo menor (se calcula entre 75000 y 77000). También contiene un 5% de cisteína, y se liga covalentemente a un carbohidrato formado por N-acetilglucosamina, manosa, glucosa y ác. N-acetilneuramínico). Sin embargo ambas moléculas difieren mucho entre sí por su composición de aminoácidos y por la movilidad electroforética.

También liga dos átomos de Fe^{+3} por molécula.

– **Ceruleoplasmina**

Esta proteína fija específicamente el cobre, pero también interviene en la movilización del hierro por la transferrina. Su origen es probablemente sanguíneo.

*** Microglobulina β 2 (lactolina)**

A diferencia de las anteriores, no contiene metales en su estructura. Consiste en un polipéptido de 98 restos, dos de los cuales son cisteína. Es pobre en fósforo y glúcidos y su peso molecular es igual a 43000 (2). Puede precipitar con la caseína isoeléctrica. El calostro es diez veces más rico en lactolina que la leche, posiblemente debido a que esta proteína está asociada al sistema inmunológico.

*** Glicoproteína α 1**

Corresponde al grupo de glicoproteínas ácidas que son retenidas en DEAE (dietil aminoetil) celulosa al hacer pasar lactosuero a pH 4,6. Consiste en una cadena de 181 restos, a la que se unen por radicales asparginil cinco grupos heteropolisacáridos. El carbohidrato constituye aproximadamente el 45 % de la molécula (8).

Es de destacar que a través del fraccionamiento por DEAE celulosa se han obtenido otros cinco compuestos con distintos estados de homogeneidad, conteniendo carbohidratos y fosfato. No se sabe si algunas de estas glicoproteínas son productos de degradación parcial de las caseínas, o si se trata de materias de la membrana. Por otro lado, se ha encontrado que estos compuestos promueven el crecimiento del *Bifidobacterium bifidum* biovar. *Pennsylvanicus*.

Características funcionales de las sueroproteínas

Además de una excelente calidad nutricional, las sueroproteínas poseen importantes propiedades funcionales tales como solubilidad, retención de agua, hinchamiento/absorción de agua, gelificación, espumado y emulsificación, lo cual amplía notablemente su campo de aplicación.

Sin embargo, puesto que es la estructura de la proteína la que determina fundamentalmente su funcionalidad, estas propiedades pueden ser modificadas por diversos factores ambientales tales como pH, temperatura, fuerza iónica, presencia de lípidos, de agentes reductores, etc., o bien mediante tratamientos térmicos adecuados ó una hidrólisis controlada.

El creciente interés por la implementación de sueroproteínas, ha propiciado una continua investigación, tendiente a evaluar la relación entre la composición y funcionalidad (20-22), o bien la relación entre las condiciones térmicas de obtención y la capacidad de gelificación y emulsificación (23) de distintos concentrados de sueroproteínas, a fin de establecer su aptitud para determinados propósitos.

Paralelamente, se realizan extensos estudios que apuntan a lograr un mejoramiento de estas propiedades, o bien conocer su respuesta ante un dado proceso de elaboración. En este sentido, se ha analizado la influencia en la funcionalidad de factores tales como pH y fuerza iónica (24), temperatura y pH

(25), temperatura y fuerza iónica (26), etc. además de la aplicación de diversos métodos enzimáticos.

Procesos de recuperación de las sueroproteínas

El suero remanente de quesería (aproximadamente el 80% de la leche empleada) constituye una fuente abundante y económica de proteínas con un alto valor nutritivo y excelentes propiedades funcionales. Su desaprovechamiento no solo representa una pérdida importante, sino también un inconveniente de naturaleza ecológica que deriva de su elevada DBO, como se indicó anteriormente. Este argumento, ha propiciado el desarrollo de diversas técnicas de nivel industrial que permiten la recuperación y el posterior procesamiento de las sueroproteínas.

A continuación se enumeran algunas de las técnicas más importantes:

a- Termocoagulación o método tradicional

Es el método más simple y económico, consiste en precipitar las proteínas mediante el calentamiento del suero acidificado a pH 4,6, y su posterior recuperación por filtración ó sedimentación (27).

b- Precipitación en frío

La precipitación de las sueroproteínas se produce por acomplejamiento mediante el empleo de agentes floculantes tales como carboximetilcelulosa (CMC), polifosfatos, sales férricas, etc. (28). Esta metodología permite separar las proteínas poco desnaturalizadas, y conservando sus propiedades funcionales.

c- Filtración por gel o tamizado molecular

Es un verdadero método de fraccionamiento que permite la separación de sales, lactosa y las proteínas. Se emplean geles de povidexano (Sephadex). Tiene el inconveniente ser una técnica de costosa realización.

d- Adsorción en columna

Se emplean resinas catiónicas o aniónicas según se trate de suero ácido (pH 4,6) o suero dulce (pH 6,6) (28). Es un procedimiento económico que permite obtener fracciones enriquecidas en el componente deseado.

e- Ultrafiltración (UF)

Es el procedimiento más difundido, en el cual se emplean membranas permeables a las sales y a la lactosa, e impermeables a las proteínas. Actualmente se utilizan membranas de polisulfonas, poliamidas u óxido de circonio. El retenido, con un 15-20% de materia seca, puede contener entre un 50-70% de proteína (en base seca), pero este valor puede elevarse hasta un 80% mediante diafiltración.

f- Hiperfiltración u Osmosis inversa (OI)

También es un proceso de membrana pero que trabaja a alta presión (en el orden de 40 bares). Da lugar a un concentrado rico en proteínas, lactosa y minerales y un permeado que es prácticamente agua.

A veces es estos procedimientos se emplean en forma combinada, por ejemplo tratando mediante OI el permeado de una UF, con lo cual se puede obtener un concentrado rico en proteínas, una solución concentrada en lactosa y un efluente con una DBO muy baja, que puede evacuarse sin peligro de polución.

g- Deshidratación

La deshidratación del suero permite obtener un polvo nutritivo de gran interés, que puede entrar a formar parte de numerosos alimentos. Esta operación, puede ser realizada tanto sobre el suero entero como sobre el suero desmineralizado. Generalmente es precedida por una concentración, la cual puede hacerse mediante una evaporación en múltiple efecto. Luego de la concentración, el suero puede ser secado mediante spray, con lo cual pueden obtenerse diversos productos industriales, con contenidos proteicos que pueden variar desde el 12,5%, para un suero en polvo entero, hasta un 30,3% (en base seca) para un suero en polvo deslactosado y desmineralizado (mediante electrodiálisis) en un 55% (29).

Si bien estos productos encuentran aplicación en formulaciones para lactantes o mezclas deshidratadas, su bajo tenor proteico los hace funcionalmente inefectivos.

En base a esto, se han desarrollado técnicas en las que se combinan U.F., evaporación y secado spray, las cuales permiten obtener un concentrado de

sueroproteínas (W.P.C.) con 35% de proteína. Sin embargo, este valor puede elevarse hasta un 50 a 75%, tratando por diafiltración el retenido de la U.F.

Asimismo, empleando técnicas de intercambio catiónico (Procesos Vistec), seguidas de ultrafiltración, evaporación y secado por spray, se obtiene lo que se conoce como aislado de sueroproteínas (W.P.I.), con más del 90% de proteína, pero con mayor costo de elaboración (29).

Algunas aplicaciones de las sueroproteínas

a- Incorporación a productos alimenticios en general

El gran valor nutritivo que poseen las proteínas del suero de leche, surge de una composición de aminoácidos sumamente favorable. En efecto, no son deficientes en ningún aminoácido, y su elevado contenido en lisina (aproximadamente un 11% en las proteínas mayoritarias), triptofano y aminoácidos azufrados, les confiere un valor biológico superior al de la caseína, lo cual les permite corregir las deficiencias de esta última, sobre todo en lo que se refiere a cisteína. Esto hace que sean un complemento ideal para la dieta de cualquier organismo en crecimiento, por lo que es común que integren ciertas formulaciones destinadas especialmente a lactantes.

Sin embargo, la incorporación de las sueroproteínas en determinados alimentos, puede obedecer no solo a su calidad nutricional, sino también a la importancia de su funcionalidad (solubilidad, retención de agua, gelificación, emulsificación, etc.). Así, se las puede encontrar en bebidas (solubilidad), postres (emulsificación y viscosidad), productos cárnicos (retención de grasa/agua), productos horneados (termocoagulación), etc. (29).

Actualmente, el interés que se ha suscitado por los alimentos dietéticos, permite a las proteínas del suero modificadas, ocupar un lugar de privilegio como sustitutos de grasa. En este sentido, se encuentran en el mercado dos productos

basados en sueroproteínas, pero con distinto procesamiento, y por ende distinta funcionalidad: Simplesse[®] y Dairy Lo[®] (30).

Estos productos, constituyen una fuente de proteínas de alta calidad, que puede ser incorporada en ciertos alimentos con bajo contenido en materia grasa, tales como postres lácteos congelados, pastas, yoghurt, quesos, etc.

b- Utilización en técnicas de microencapsulamiento

La microencapsulación, es una técnica mediante la cual pequeñas gotitas de líquido o partículas de sólido, son cubiertas con un fino film de agente microencapsulante, al cual se conoce como pared. De este modo, el material microencapsulado o centro, puede protegerse contra la evaporación o pérdida de volátiles, oxidación u otro tipo de deterioro, y ser luego liberado bajo las condiciones deseadas, lo cual facilita su manipulación. Por este medio se pueden vehicular sustancias tales como saborizantes, vitaminas, aceites esenciales, etc.

El estudio de la funcionalidad de las sueroproteínas, ha demostrado que éstas reúnen los requisitos necesarios para ser empleadas como agentes microencapsulantes. Así, su aptitud para formar el film, elevada solubilidad, capacidad emulsificante y secante y baja viscosidad en soluciones concentradas, ha permitido que se las ensaye, bajo distintas condiciones, con resultados altamente satisfactorios (31-33).

c- Elaboración de quesos con inclusión de las proteínas del suero

La inclusión de las proteínas del suero en quesos, puede obedecer fundamentalmente a dos objetivos principales; aumentar el rendimiento y valor nutritivo del producto, o bien permitir una reducción en el contenido de materia grasa del mismo, sin perjuicio de su calidad.

*** Mejora del rendimiento quesero**

Para esta finalidad, a nivel industrial se han desarrollado dos procedimientos diferentes:

– Procedimiento con reincorporación de las proteínas del suero (Centri-Whey)

Este procedimiento, desarrollado en Francia por Alfa-Laval y Genvrain en 1968 (34), consiste en recuperar en forma convencional (calentamiento y acidificación) las proteínas del lactosuero con el fin de incorporarlas a la leche de quesería. Mediante esta técnica, se obtiene un concentrado proteico con un 15% de extracto seco, donde se recupera entre un 90 a 95% de las proteínas del suero (aproximadamente el 5% es lactosa), el cual se agrega a la leche de la siguiente elaboración.

El procedimiento Centri-Whey se ha aplicado con éxito a la fabricación de queso Camembert y Saint-Paulin, produciendo un aumento en el rendimiento del 10 al 12% (35).

– **Procedimiento por Ultrafiltración (M. M. V.)**

El procedimiento M.M.V., patentado en Francia por Maubois y Col. 1969-1971) (34), es un proceso de membrana que permite separar el lactosuero antes de la coagulación enzimática.

Si bien este proceso al igual que el Centri-Whey aumenta el rendimiento quesero, la diferencia estriba en el hecho de que por UF, las proteínas son poco ó nada desnaturalizadas según las temperaturas aplicadas a la leche.

*** Obtención de quesos con contenido reducido en materia grasa**

La adición de proteínas de suero en quesos, es una metodología que también encuentra aplicación en la preparación de quesos con bajo contenido en materia grasa. Efectivamente, la incorporación de sueroproteínas modificadas, a través de aditivos tales como Simplese[®] o Dairy Lo[®] a una leche de elaboración con bajo porcentaje de grasa, es uno de los métodos más difundidos para mejorar las características del producto obtenido. Actualmente, a nivel internacional, se está trabajando principalmente en quesos Cheddar (36) y Mozzarella (37). En nuestro país, ante la ausencia de antecedentes en el tema, en el Programa de Lactología Industrial (PROLAIN) de la Facultad de Ingeniería Química (UNL), se ha comenzado a trabajar en queso cremoso, obteniendo resultados altamente alentadores. Esta línea de investigación, que constituye el eje de los proyectos en desarrollo, contempla su extensión a otros tipos de quesos, tales como el Pategrás argentino.

*** Incidencia de las sueroproteínas en la maduración del queso**

A pesar de la ventaja que representa en lo atinente al rendimiento, la inclusión de las proteínas del suero en un queso puede llegar a interferir en el normal desarrollo de la maduración. En efecto, se ha encontrado que el alto contenido de **β -lactoglobulina**, desnaturalizada o no, puede inhibir la actividad proteolítica de la plasmina (13), principalmente hacia la **β caseína**. En base a ello, algunos autores proponen la adición de uroquinasa (activador del plasminógeno) a fin de incrementar la acción de la plasmina en los quesos elaborados por U.F. (14).

Análogamente, C. G. Lo y col. (38) han demostrado que la **β -lactoglobulina**, térmicamente desnaturalizada, inhibe más la acción de la quimosina hacia la **α 1 caseína**, que en su forma nativa, siendo su efecto estimulado por la presencia de cationes divalentes, en especial Ca^{+2} .

A su vez, Von W. Krause y col. (39), han demostrado que la **α -lactoalbúmina** también puede retardar en la acción de proteasas como tripsina ó quimosina sobre otras proteínas, en especial la caseína.

Por otro lado, más allá del efecto inhibitor, se ha sugerido que la baja actividad proteolítica detectada en los quesos elaborados por ultrafiltración, podría deberse también al aumento en la viscosidad de la fase acuosa producido por la presencia de las sueroproteínas, el cual reduciría la velocidad de difusión de la enzima (38). No obstante, algunos investigadores sostienen que la mayor a_w

asociada a la retención de humedad de las sueroproteínas, puede favorecer la actividad del coagulante residual hacia las caseínas (40).

Indirectamente, los quesos elaborados con leche ultrafiltrada a pH 6-7, poseen una elevada capacidad buffer que retarda la velocidad de autólisis del fermento. Esto trae como consecuencia un atraso en la proteólisis principalmente de las **caseínas α** y **β** . En virtud de ello, en este tipo de quesos puede ser conveniente el empleo de starters compuestos por bacterias con elevado potencial proteolítico ó productor de flavor. Asimismo, también se puede recurrir a la incorporación de enzimas productoras de flavor, teniendo la ventaja de que éstas no se perderán como en los quesos tradicionales, en los que las pérdidas pueden ser de 80 a 90% (41).

Sin embargo, la incidencia de las sueroproteínas en la maduración de los quesos no se limita sólo a su interferencia en los procesos proteolíticos propios a la misma, puesto que también se ha demostrado que su marcada resistencia a la acción de los sistemas enzimáticos presentes, puede conducir a alteraciones en las características del producto.

Dado que esta cuestión constituye la base del presente estudio, la misma se trata con más detalle en el punto siguiente.

d- Hidrólisis enzimática de las sueroproteínas

*** Estado actual de los conocimientos**

La hidrólisis enzimática de las proteínas del suero, es un aspecto que entraña una singular importancia, por cuanto está vinculada a cualquier aplicación que éstas encuentren. En efecto, dado que la proteólisis, al igual que los tratamientos térmicos, es un efectivo alterador de la estructura proteica, será un determinante de su funcionalidad y por ende de su idoneidad.

Sin embargo, dadas las distintas funciones biológicas que deben cumplir, como por ejemplo la **β -lactoglobulina** transporta retinol, la **α -lactoalbumina** interviene en la síntesis de la lactosa, las **Inmunoglobulinas** transmiten inmunidad, etc. las sueroproteínas tienen una conformación que les confiere una elevada resistencia a la hidrólisis enzimática. En este sentido existe una gran diferencia con las caseínas dado que al ser su función principal la de nutrir proveyendo aminoácidos, estas proteínas poseen una estructura abierta y flexible que las hace accesibles a las proteasas y por lo tanto muy susceptibles a su acción.

En la hidrólisis de las sueroproteínas conviene diferenciar aquella que se induce ex profeso con alguna finalidad, de la que pueden ocasionar los sistemas enzimáticos inherentes al medio al cual se incorporan.

*** Actividad enzimática inducida**

Se ha demostrado que bien conducidas, las técnicas enzimáticas constituyen una notable herramienta que permite modificar determinadas propiedades de las sueroproteínas a fin de posibilitar su inclusión en ciertos alimentos, o bien elucidar algunas de sus características más relevantes.

En este sentido, la hidrólisis de sueroproteínas mediante proteasas específicas, encuentra aplicación en ciertas áreas de la investigación, como ser el mejoramiento de la funcionalidad de los W.P.C. (42-45), o la disminución de las características alérgicas de las sueroproteínas mayoritarias (46-49). Asimismo, las técnicas enzimáticas han servido para evaluar determinadas propiedades de las moléculas de las proteínas del suero, tales como su flexibilidad (25), y en el caso de la **lactoferrina** bovina han permitido investigar las regiones responsables de sus funciones biológicas (19).

*** Actividad enzimática inherente al medio al que se incorporan**

Cuando las proteínas del lactosuero son incorporadas a un determinado medio, es preciso conocer su potencial proteolítico dado que éste puede modificar sensiblemente el fin que se persigue. Por ejemplo, cuando se emplean sueroproteínas como material microencapsulante, es fundamental tener en cuenta el pH y la naturaleza enzimática de la superficie del material a recubrir. Reyad y col. (33), han demostrado que aún entrecruzados con transglutaminasa, los film

de sueroproteínas son susceptibles a proteasas como tripsina o α -quimotripsina, lo cual conduce a una reducción en la estabilidad de los mismos.

Sin embargo, donde se pone de mayor relieve la importancia de la actividad proteolítica del medio al cual se incorporan las sueroproteínas, es en los quesos, donde su presencia está estrechamente ligada a los fenómenos de la maduración.

Tal como se indicó en el punto anterior, en los quesos elaborados mediante técnicas de ultrafiltración, la presencia de las proteínas del lactosuero, principalmente **β -lactoglobulina** y **α -lactoalbúmina**, puede alterar el proceso de maduración, no sólo obstaculizando la acción enzimática de la plasmina y del coagulante, sino también exhibiendo una elevada resistencia a hidrolizarse. Esto, al parecer, podría deberse a que al no estar desnaturalizadas, las sueroproteínas exhiben una mayor resistencia a la actividad proteolítica del cuajo o de las proteasas del starter (41), (50-51). En este sentido, algunos investigadores, trabajando con quesos enriquecidos con sueroproteínas térmicamente desnaturalizadas, han detectado que durante la maduración, éstas permanecen inalteradas, aún utilizando un coagulante microbiano de *Mucor Miehei* (40).

En base a esto, ciertos autores han sugerido que la inalterabilidad de las sueroproteínas, podría ser empleada como un marcador para detectar el uso de leche ultrafiltrada en la elaboración de quesos (52).

Por otro lado, al permanecer insensibles ante la acción del cuajo, y poseer un sabor neutro, las proteínas mayoritarias del lactosuero no darán lugar al

desarrollo de sabores impropios. Sin embargo, puede ocurrir que a igual grado de maduración, un queso UF presente un sabor menos pronunciado que un queso standard, lo que se debería a la baja concentración de los productos de hidrólisis responsables del flavor en los primeros (50).

Con respecto a las proteínas minoritarias, hay quienes sostienen que las variaciones en el contenido de **inmunoglobulinas** y de **proteosa-peptona**, pueden producir significativas variaciones en el flavor (41), lo que posiblemente se deba a que estas fracciones al igual que la **seroalbúmina** son susceptibles a la acción de la renina (51).

I.3- OBJETIVO DEL TRABAJO

De este análisis, se desprende que el conocimiento de las transformaciones que pueden sufrir las sueroproteínas por acción de determinadas proteasas, reviste un interés muy especial, que ha dado un fuerte impulso a su estudio.

A pesar de que el espectro enzimático investigado, es considerablemente amplio, la información referida a enzimas coagulantes, en especial cuajos microbianos y cuajos genéticos es relativamente escasa. Por este motivo, en el presente trabajo se encara el estudio de la acción de distintos coagulantes comerciales y de sus enzimas constitutivas, en diversas condiciones.

Los resultados serán de interés para ser aplicados al estudio del proceso de maduración de quesos en los que se han incluido sueroproteínas en su elaboración.

El estudio se complementa además con el análisis del efecto de ciertas proteasas de uso en la industria alimenticia sobre las proteínas de suero, en la seguridad de que los datos que aporte resultarán de potencial utilidad en todos los ámbitos que han sido tratados en esta primera parte.

II- MATERIALES Y METODOS

II.1- ENSAYOS IN VITRO

Obtención del sustrato

La susceptibilidad enzimática in vitro de las sueroproteínas, fue ensayada bajo tres condiciones de las mismas:

- Sueroproteínas nativas
- Sueroproteínas parcialmente desnaturalizadas
- Sueroproteínas puras

a- Sueroproteínas nativas: Suero isoelectrico

*** Metodología**

Las sueroproteínas nativas fueron obtenidas a partir de suero isoelectrico preparado con leche descremada. Las principales etapas de la técnica empleada, fueron las siguientes:

Descremado de la leche: mediante centrifuga de platos Alfa-Laval se descremó leche fresca (pH $6,6 \pm 0,1$ y Acidez 16-18 °Dornic) hasta un 0,05% de materia grasa.

Ajuste de pH: La leche descremada fue llevada a pH 4,6 con ác. clorhídrico 0,1N. Todas las determinaciones de pH se realizaron empleando un pHmetro Orion Model 720, Orion Research Incorporated (USA), provisto de electrodo combinado (vidrio y calomel), calibrado con buffers pH 7,0 y 4,0 antes de cada lectura

Separación del residuo insoluble: El sobrenadante fue primeramente centrifugado a 3000 g durante 10 min., mediante centrífuga discontinua de laboratorio, Rolco S.R.L. r.p.m. x 1000, y posteriormente filtrado a través de papel de filtro cualitativo (común).

Fraccionamiento: El filtrado obtenido, fue repartido en fracciones de 200 ml., previa adición del 1% de solución de thymerosal al 1%.

Cada una de estas fracciones constituyó el sustrato sobre el cual fueron ensayadas las diferentes enzimas.

*** Consideraciones respecto a la metodología empleada**

La técnica adoptada se ajusta a la utilizada por Vegarud y col. (9), en su estudio de las distintas variantes genéticas de las caseínas y de las sueroproteínas.

La alternativa de trabajar con sueros al cuajo fue desechada, en virtud de que éstos pueden conservar aproximadamente entre un 94 y un 97% del coagulante empleado (53), lo cual depende entre otras cosas de la acidez de la leche (35), (54). Este hecho, indudablemente interfiere con el propósito del presente trabajo.

Asimismo, también se descartó la opción de trabajar con concentrados de sueroproteínas comerciales (W.P.C.), por cuanto ellos pueden contener entre 20 y 50% de proteína desnaturalizada según el método de obtención usado (23).

b- Sueroproteínas parcialmente desnaturalizadas

*** Metodología**

Un aspecto importante en lo que respecta a la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática de las proteínas del suero, es el grado de desnaturalización que éstas exhiban. En efecto, un tratamiento térmico adecuado que produzca una apertura de la molécula, podría permitir la exposición de sitios específicos de ataque enzimático, que en la estructura nativa se encontrarían ocultos (55-56). Por el contrario, podría ocurrir también, que una alteración en la estructura terciaria de la proteína obstaculice en alguna medida la acción de la enzima, lo cual conduciría a una disminución de su susceptibilidad.

Para las condiciones de desnaturalización parcial, se empleó como sustrato Dairy Lo[®] *, el cual, según su especificación técnica, es un concentrado con 35% de proteína.

* Dairy Lo[®] es una marca registrada de Pfizer Inc., New York.

Las principales etapas para la preparación del sustrato a partir de Dairy Lo[®], fueron las siguientes:

Cálculo de la cantidad de Dairy Lo[®]: Para este ensayo se adoptó la misma concentración proteica que para el suero isoeléctrico, o sea 0,6%. Por lo tanto, lo primero que se hizo fue verificar en forma analítica el tenor proteico de este concentrado. Para ello, se adoptó el método de Kjeldahl, de acuerdo a la norma FIL-IDF 20B: 1993 (57), empleando una unidad digestora con capacidad para seis tubos: Tecator - Digestion System 6 - 1007 Digester, con sistema de aspiración de humos.

Para esta determinación se procesaron dos muestras de Dairy Lo[®] de 0,5 gr. cada una, las cuales arrojaron un contenido proteico promedio del 35,04%.

De este modo, considerando que este aditivo contiene un 35% de proteína, se tomó una fracción de 17,15 gr para ser posteriormente disuelta en 1 litro de agua destilada.

Disolución de Dairy Lo[®]: Se siguió la metodología empleada por D.J. Mc Mahon (37). El peso de Dairy Lo[®] calculado (17,15 gr) fue previamente disuelto en 350 ml de agua destilada, y tratado a 80°C durante 10 min. Luego de enfriado a 35°C, el volumen se ajustó a 1 litro.

Fraccionamiento: La solución obtenida fue pasada a través de un Tamiz N°60, a los efectos de verificar ausencia de grumos, recogiendo una alícuota de 600 ml. A esta última se adicionó el 1% de solución de thimerosal al 1%, y finalmente se repartió en 3 fracciones de 200 ml cada una.

*** Consideraciones respecto a la metodología empleada**

Para esta determinación se adoptó Dairy Lo[®] dado que se trata de un aditivo sustituto de la materia grasa de amplia difusión, y por lo tanto resulta una de las formas de sueroproteínas parcialmente desnaturalizadas (60-80%) (30) más frecuentemente encontradas en ciertos productos semimagros.

c- Sueroproteínas puras

Se estudió la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática de **α -lactoalbúmina** y **β -lactoglobulina** puras de Sigma Chemical Company (S.t. Louis, M.O. U.S.A.). Las soluciones para cada proteína fueron hechas en base a las concentraciones dadas por de Wit (5): 3 gr/lit para **β -lg**, y 1,2gr para **α -la**.

*** Consideraciones respecto a la metodología empleada**

Se trabaja con la **α -la** y **β -lg** puras, puesto que son éstas las principales responsables de las características que confieren las sueroproteínas a aquellos productos a los que se incorporan. Por ejemplo, han sido sindicadas como las principales responsables de las características alérgicas en formulaciones infantiles, de las propiedades funcionales de W.P.C., etc. De allí que resulta útil conocer el nivel de proteólisis que dichas proteínas puedan experimentar cuando se las adopta con alguna finalidad.

Enzimas ensayadas

Para estudiar la susceptibilidad hidrolítica de los sustratos seleccionados, se ensayaron distintas enzimas, las que pueden clasificarse en:

a- Enzimas coagulantes puras (patrones)

Se emplearon tres enzimas coagulantes puras: una pepsina porcina, una bovina, y una renina bovina, cuyas principales características se detallan a continuación:

*** Pepsina porcina**

– Características generales

Se empleó la enzima pura provista por como patrón por Chr. Hansen's Laboratorium A/S (Dinamarca).

El término Pepsina, sin establecer ninguna especificación, en general alude a la pepsina de cerdo. Esta enzima ha sido objeto de los estudios enzimáticos más antiguos, y sus cristales fueron los primeros en ser analizados por cristalografía por Rayos X. Es una fosfoproteína de peso molecular igual 34500. La mucosa gástrica segrega una forma inactiva llamada **pepsinógeno**, el cual se activa autocatalíticamente a pH inferior a 5, sufriendo una proteólisis limitada en la que se remueve un residuo peptídico de 41 aminoácidos en la zona del nitrógeno terminal (58).

Es una endopeptidasa, perteneciente grupo de las proteasas ácidas, puesto que posee un pH óptimo de actividad inferior a 2. Sin embargo, este valor depende del sustrato, y en el caso de las proteínas, también de su estado conformacional. Por ejemplo, actuando sobre la hemoglobina o la seroalbúmina, tiene un óptimo igual a pH 2, pero sobre los sustratos desnaturalizados, este valor se corre a alrededor de 3,5 (59).

Bajo la nueva nomenclatura se la considera del tipo de las proteasas aspárticas, por involucrar dos residuos de ácido aspártico en su centro activo (35).

En cuanto a la actividad específica, es sabido que las pepsinas cortan uniones peptídicas donde participan aminoácidos con largas cadenas hidrofóbicas, como leucina (55), y preferentemente aromáticos, como fenilalanina (59).

Su alta dependencia con el pH, ha limitado su aplicación en la industria casearia. En efecto, su actividad se inhibe a pH superiores a 6,6 (35), por lo que a pH 6,8 no coagula la leche. Además, siendo su pH óptimo próximo a 2, su participación en la maduración es muy limitada. Sin embargo, en la industria quesera de Estados Unidos se la utiliza mezclada con pepsina bovina y quimosina (60).

– **Actividad coagulante**

La actividad de las enzimas coagulantes estudiadas, fue evaluada a través de la determinación del título, definido como los mililitros de leche que puede

coagular 1 ml de coagulante en 40 minutos a 35°C. Para tal fin, se adoptó el Método de Berridge, modificado por Huck y Zalazar (61) (Ver Anexo I).

El título de la pepsina porcina pura, determinado por este método resultó 1: 540000.

*** Pepsina bovina**

– Características generales

Se usó la enzima pura provista por Chr. Hansen's Laboratorium A/S (Dinamarca).

El término pepsina bovina, sin ninguna especificación, se refiere a la pepsina bovina II o A, puesto que si bien existe una pepsina bovina I o B, esta es minoritaria. Ambas se distinguen por la velocidad de inactivación en presencia de urea (35).

Si bien la pepsina bovina es muy similar a la porcina, la primera puede soportar valores de pH más elevados. En efecto, mientras que la pepsina porcina se inactiva mediante un tratamiento a pH 7,5 (buffer TRIS/HCl) a 30°C, durante 3 minutos, para inactivar la pepsina bovina se requiere 1 hora a 20°C, a pH 9 (60). Asimismo, la pepsina bovina tiene una actividad coagulante menos dependiente del pH que la pepsina porcina, dado que puede coagular la leche hasta pH 6,9.

– **Actividad coagulante**

El título de la pepsina bovina pura, determinado por el Método de Berridge, modificado por Huck y Zalazar, resultó igual a 1: 64000

* **Renina bovina**

– **Características generales**

Se usó la enzima pura provista por Chr. Hansen's Laboratorium A/S (Dinamarca).

La renina o quimosina bovina, es el principal componente de los cuajos de ternero mamón. Esta enzima es secretada por el abomaso (cuajar) en forma inactiva: la proquimosina, la cual se activa autocatalíticamente a pH ácidos (a pH 2, la activación es instantánea) (35), (59). Es una holoproteína (no contiene átomos de fósforo ni de metal, ni de glúcidos), de P.M. 34.400, que puede obtenerse pura y cristalizada, por repetidas precipitaciones en cloruro de sodio.

Al igual que las pepsinas, es una proteasa ácida, del tipo de las proteasas aspárticas. Su pH óptimo de actividad proteolítica depende del sustrato, por ejemplo, es 3,4 sobre la hemoglobina y se acerca a 4,0 sobre la caseína (35), (59).

Existen tres quimosinas: A, B y C, las cuales se pueden separar por cromatografía en columna. De estas tres, las más comunes son las A y B. La quimosina A es más activa que la B, de la que sólo difiere en el aminoácido 290, en que se ha sustituido el ácido Aspártico por una Glicina (62).

En el rango de pH 5,3 - 6,3 la quimosina exhibe una buena estabilidad, pero fuera de esta zona se vuelve inestable: hacia pH 2 se tiene una estabilidad limitada, mientras que a pH superior a 8,0 se desnaturaliza irreversiblemente (35).

Asimismo, la presencia de agentes disociantes como la urea también puede producir una desnaturalización irreversible.

La acción específica de la quimosina sobre una cadena peptídica es semejante al de la pepsina, pero un poco más estrecha; rompe preferentemente los enlaces entre aminoácidos hidrofóbicos, especialmente los que se dan entre la leucina y la fenilalanina (54).

– **Actividad coagulante**

El título de la quimosina bovina pura, determinado por el Método de Berridge, modificado por Huck y Zalazar, resultó igual a 1: 88000

b- Mezclas comerciales de enzimas coagulantes

Como mezclas comerciales de enzimas coagulantes se ensayaron un coagulante de origen animal, tres coagulantes de diverso origen microbiano y una renina producida por fermentación. A continuación se describen algunas de sus características más relevantes.

*** Coagulante de origen animal**

– Cuajo bovino

Se usó cuajo líquido de bovino adulto, producto comercializado en Argentina por Laboratorios Chr. Hansen Argentina (Quilmes, Buenos Aires, Argentina).

Características generales

Es el cuajo de mayor difusión en nuestro país, dado que es normalmente considerado idóneo para los diversos procesos casearios.

Consiste en una mezcla de quimosina y pepsina (principalmente la pepsina II o A), con predominancia de esta última.

Actividad coagulante

El título del cuajo líquido de bovino adulto, determinado por el Método de Berridge, modificado por Huck y Zalazar, resultó igual a 1:10000.

*** Coagulantes de origen microbiano**

– Coagulante microbiano MR 90 - A de Solvay Enzimas S.A. (Buenos Aires, Argentina)

Características generales

Es una proteasa aspártica similar a las proteasas gástricas, producida por desarrollo de *Mucor miehei*, hongo termófilo banal del suelo, en un medio de cultivo adecuado.

La secuencia aminoacídica conocida para esta proteasa, presenta numerosas posiciones idénticas a las proteasas gástricas, en particular en la zona del centro activo (35).

La proteasa de *Mucor miehei*, es considerada como una de las más termorresistentes. Su estabilidad térmica aumenta con el descenso de pH; por ejemplo, en el lactosuero, a pH superior a 6,0 su inactivación requiere 25 segundos a 75°C, mientras que a pH 5,0 son necesarios 25 segundos a 80°C (35). Sin embargo, a pH 2 en buffer HCl/ClK y en presencia de urea 5,0 M, se inactiva a 30°C durante 5 a 10 minutos (60).

La resistencia térmica del coagulante de *Mucor miehei*, está considerada como una desventaja en los procesos casearios, dado que al ser muy activa, y no destruirse durante la cocción de la pasta, puede conducir a una maduración impropia del queso. Por ello, este tipo de coagulante no es recomendado para la elaboración de quesos duros y semiduros de altas exigencias organolépticas, aunque en quesos blandos, sin embargo, da buenos resultados. Asimismo, la resistencia de estas enzimas a las altas temperaturas, puede provocar problemas en la posterior utilización del suero de quesería, como por ejemplo, en la preparación de alimentos para el ganado.

Actividad coagulante

El título de MR 90 - A, calculado mediante el Método de Berridge modificado por Huck y Zalazar, resultó igual a 1:30000.

- **Coagulante microbiano MR 90 - B de Solvay Enzimas S.A. (Buenos Aires, Argentina)**

Características generales

El MR 90 - B, es un coagulante experimental, también obtenido a partir del desarrollo de *Mucor miehei*, pero a diferencia del MR 90 - A, es una proteasa termo lábil. Esta variante, intenta subsanar el inconveniente que genera la termoestabilidad de la proteasa producida por este hongo.

Actividad coagulante

El título de MR 90 - B calculado mediante el Método de Berridge, modificado por Huck y Zalazar, resultó igual a 1:35000

- **Coagulante microbiano MEITO en polvo**

Características generales

Es una proteasa ácida, perteneciente al grupo de las proteasas aspárticas producida por el desarrollo de *Mucor pusillus*, hongo banal mesófilo del suelo. Esta enzima fúngica, además de ser termoestable, es la más resistente a los pH elevados; puede soportar un tratamiento de 60 min. a 20°C, a pH 9,0 (60).

Actividad coagulante

El título del coagulante MEITO en polvo, determinado por el Método de Berridge modificado por Huck y Zalazar, resultó igual a 1:200000.

*** Renina producida por fermentación**

– Renina de *Kluyveromyces lactis* MAXIREN de Gist - Brocades

Características generales

Es una renina producida por fermentación de la levadura *Kluyveromyces lactis* modificada genéticamente. Los coagulantes genéticos, surgen como una alternativa que permite satisfacer la fuerte demanda que existe por el tradicional cuajo de ternero mamón (63). Es de destacar que hasta el momento no se han detectado diferencias entre las reninas o quimosinas producidas por fermentación, y las de origen bovino (64-65).

Actividad coagulante

El título de la renina MAXIREN, determinado por el Método de Berridge modificado por Huck y Zalazar, resultó 1:110000.

c- Enzimas proteolíticas comerciales

Se usaron tres productos de uso alimenticio:

- * Proteasa líquida de *Bacillus subtilis* N 8000 de Ensur S.A. Montevideo, Uruguay.**
- * Proteasa en polvo de *Bacillus subtilis* N 34500 de Ensur S.A. Montevideo, Uruguay.**
- * Proteasa en polvo de *Aspergillus oryzae* 31000 de Miles Laboratories Inc., Elkhart Ind., USA.**

Características generales

Estas proteasas de uso alimenticio, han sido anteriormente empleadas con el objeto de producir una aceleración en el proceso de maduración del queso Pategrás (66).

Las dos primeras son proteasas serínicas de amplia especificidad, en especial hacia las uniones Leu-X (42), mientras que la tercera es una proteasa ácida.

Sus actividades proteolíticas fueron analizadas in vitro sobre caseinato de sodio, bajo distintas condiciones, y los resultados obtenidos fueron la base para su aplicación casearia.

Hidrólisis de las sueroproteínas

Dado que todas las enzimas estudiadas son de aplicación casearia, se procuró conducir la hidrólisis de las sueroproteínas bajo condiciones que se acerquen a las que podrían darse en una maduración de queso, que es el campo de aplicación donde mayor utilidad pueden encontrar los resultados del presente trabajo.

a- Hidrólisis del suero isoelectrico

*** Condiciones de incubación**

En base a la consideración precedente, se adoptaron las siguientes variables:

– pH del sustrato

El pH del sustrato se ajustó en 5,4, el cual es un valor próximo al que existe en la masa de un queso durante la maduración. Este valor además está dentro del rango de pH óptimo que poseen las proteasas ácidas del tipo de las ensayadas. Por ejemplo, Schmidt y col. eligen un pH 5,5 para estudiar la acción de la quimosina sobre las sueroproteínas (67). Por lo tanto, para la experiencia, el suero isoelectrico (pH 4,6) fue llevado a pH 5,4 mediante una solución de NaOH 1 M.

No obstante, en el caso de las pepsinas cuyos pH óptimos son sensiblemente más bajos, además de trabajar a pH 5,5, se hicieron experiencias a pH 2,0.

– **Temperatura de incubación**

El rango de temperaturas en que se puede desarrollar la hidrólisis de las sueroproteínas, según la bibliografía, está comprendido entre 25 y 50°C, independientemente de la enzima ensayada. Para este estudio se eligió una temperatura promedio de 37°C, la cual además de ser coincidente con la adoptada en diversos trabajos (51-56), es una temperatura próxima a la que se permanece una cuajada en molde. Por lo tanto, una vez inoculadas, las muestras fueron colocadas en una estufa de incubación regulada a dicha temperatura.

– **Tiempo de incubación**

Para el presente estudio se fijó un tiempo de reacción de 48 horas. Transcurrido dicho tiempo, la reacción fue detenida por la adición de los agentes precipitantes: ácido tricloroacético y ácido fosfotúngstico, como se detalla más adelante. Es de destacar que se eligió un tiempo considerablemente superior a los que se indican en la bibliografía (39), (55-56), (67), con el objeto de asegurar el mayor nivel de proteólisis posible.

*** Relación enzima/sustrato**

Teniendo en cuenta la resistencia a la hidrólisis por acción de los agentes coagulantes que exhiben las sueroproteínas, y a fin de lograr una profunda hidrólisis dentro de las 48 horas, para establecer la relación enzima/sustrato se resolvió incrementar las cantidades que se emplean normalmente en los procesos casearios. Empero, puesto que los distintos coagulantes ensayados no poseen el mismo título, para obtener resultados comparables, las proporciones correspondientes a cada uno, fueron evaluadas en forma relativa. Para ello, se tomó como referencia el cuajo líquido de bovino adulto, el cual además de ser el de mayor difusión en nuestro país, posee un título lo suficientemente bajo como para que todas las muestras puedan estandarizarse por dilución a ese valor, trabajando así a título constante.

Para incrementar la concentración de dicho coagulante, se tuvo en cuenta la forma en que ésta afecta la velocidad de hidrólisis, dado que en una reacción enzimática, para una determinada concentración de sustrato, el aumento que se produce en la velocidad de Michaelis-Mente, debido a un incremento en la cantidad de enzima, resulta significativo para bajas concentraciones, pero a medida que éstas se elevan, su incidencia se hace menos perceptible, hasta llegar a un valor máximo a partir del cual se hace despreciable (68).

En base a esto, se hicieron cuatro experiencias previas con el cuajo líquido de bovino adulto, en las cuales se empleó la concentración promedio en que habitualmente se lo utiliza en quesos duros o semiduros (40 ml./100 litros de

leche), el doble, el triple y el cuádruple de la misma. De este modo, mediante el método analítico que se describe a continuación, se pudo constatar que entre estas dos últimas concentraciones no se detectaron diferencias significativas (Ver Anexo II).

De acuerdo a este resultado, se decidió adoptar como base el cuajo líquido de bovino adulto a una concentración tres veces superior a la que habitualmente se emplea en tina, y a partir de allí las cantidades correspondientes a los demás se calcularon tal como se detalla a continuación:

– Cuajo líquido de bovino adulto de Título 1:10000

Como ya se indicó, en la elaboración de quesos duros o semiduros, este coagulante se adiciona en un promedio de 40 ml./100 litros de leche, equivalentes a 0,08 ml./200 ml. Como para esta experiencia se adopta el triple de esta concentración, la proporción empleada fue 0,24 ml./200 ml de suero. Esta relación está en el orden de la empleada por Jost y col.(51), quienes adicionan 1 ml de cuajo comercial/ litro de leche, para obtener muestras de suero al cuajo, para estudiar la susceptibilidad de las sueroproteínas hacia las proteasas de este último.

Procedimiento

Siguiendo la metodología empleada por Zalazar y col. (65), se hizo una solución madre, colocando 2,4 ml del cuajo líquido de bovino adulto, en 10 ml de buffer acetato, 0,2 M, pH 5,4 preparado como describe G. Gomori (69), y de esa solución se adicionó 1 ml a 200 ml de suero a idéntico pH.

– **Pepsina porcina pura de Chr. Hansen's Lab. A/S.**

Como el título de la experiencia ha de mantenerse constante, 0,24 ml del coagulante líquido de bovino adulto de título 1:10000 (tomado como referencia), para 200 ml de suero corresponden a 0,0044 gr de pepsina porcina pura, de título 1: 540000

Procedimiento

Con la pepsina porcina se trabajó bajo dos condiciones diferentes:

- a- A pH 5,4: para lo cual se hizo una solución madre colocando 0,44 gr de pepsina porcina pura en 100 ml del buffer acetato de pH 5,4, y luego se adicionó 1ml de esa solución a 200 ml de suero, a idéntico pH.
- b- A pH 2,0 (óptimo de la enzima): para lo cual se disolvió igual cantidad de la enzima en 100 ml de buffer HCl/KCl 0,2 M de pH 2, preparado como indica G. Gomori (69), y luego se adicionó 1 ml de esa solución a 200 ml de suero a idéntico pH.

– **Pepsina bovina pura de Chr. Hansen's Lab. A/S.**

Bajo las mismas consideraciones que en los casos anteriores, 0,24 ml de cuajo líquido de bovino adulto, de título 1:10000, corresponden a 0,038 gr. de pepsina bovina pura, de título 1:64000

Procedimiento

También con la pepsina bovina se trabajó bajo dos condiciones diferentes:

a- A pH 5,4: para lo cual se hizo una solución madre colocando 3,8 gr de pepsina bovina pura en 100 ml del buffer acetato de pH 5,4, y luego se adicionó 1 ml de esa solución a 200 ml de suero, a idéntico pH.

b- A pH 2,0 (óptimo de la enzima): para lo cual se disolvió igual cantidad de la enzima en 100 ml del buffer HCl/KCl 0,2 M de pH 2, y luego se adicionó 1 ml de esa solución a 200 ml de suero a idéntico pH.

– **Renina bovina pura de Chr. Hansen’s Lab. A/S.**

Bajo las mismas consideraciones que en los casos anteriores, 0,24 ml de cuajo líquido de bovino adulto, de título 1:10000, corresponden a 0,027 gr. de renina bovina pura, de título 1:88000

Procedimiento

Se hizo una solución madre colocando 2,7 gr de renina bovina pura en 100 ml del buffer acetato de pH 5,4, y de esa solución se adicionó 1 ml a 200 ml de suero, a idéntico pH.

– **Coagulante MR 90 - A**

Bajo las mismas consideraciones que en los casos anteriores, 0,24 ml de cuajo líquido de bovino adulto, de título 1:10000, corresponden a 0,08 ml de coagulante MR 90 - A, de título 1:30000.

Procedimiento

Se hizo una solución madre colocando 8 ml del coagulante MR 90 - A en 100 ml del mismo buffer acetato de pH 5,4, y de esa solución, se adicionó 1ml a 200 ml de suero a idéntico pH.

– **Coagulante MR 90 - B**

Bajo las mismas consideraciones que en los casos anteriores, 0,24 ml de cuajo líquido de bovino adulto, de título 1:10000, corresponden a 0,068 ml de MR - B de título 1:35000.

Procedimiento

Se hizo una solución madre colocando 6,8 ml de coagulante MR 90 - B en 100 ml del buffer acetato de pH 5,4, y de esa solución se adicionó 1 ml a 200 ml de suero a idéntico pH.

– **Coagulante MEITO en polvo**

Bajo las mismas consideraciones que en los casos anteriores, 0,24 ml de cuajo líquido de bovino adulto, de título 1:10000, corresponden a 0,012 gr. del coagulante MEITO de título 1:200000.

Procedimiento

Se hizo una solución madre colocando 1,2 gr del coagulante MEITO, en 100 ml del buffer acetato de pH 5,4, y de esa solución se adicionó 1 ml a 200 ml de suero a idéntico pH.

– **Coagulante MAXIREN de Gist Brocades**

Bajo las mismas consideraciones que en los casos anteriores, 0,24 ml de cuajo líquido de bovino adulto, de título 1:10000, corresponden a 0,0218 gr. del coagulante MAXIREN de título 1:110000.

Procedimiento

Se hizo una solución madre colocando 2,18 gr. de coagulante MAXIREN en 100 ml del buffer acetato de pH 5,4, y de esa solución se adicionó 1 ml a 200 ml de suero a idéntico pH.

– **Proteasa líquida de Bacillus subtilis N 8000 de Ensur S.A.**

Tal como se indicara, esta proteasa fue utilizada como un medio para acelerar el proceso de maduración del queso Pategrás (66). En tal oportunidad, se la empleó en dos concentraciones, adicionándose 1 y 2 ml de enzima, por cada 50 litros de leche. Dado que la segunda concentración condujo a un queso con malas características organolépticas, para esta experiencia, se adoptó 1 ml/50 litros, lo que corresponde a 0,004 ml de enzima/200 ml de suero.

Procedimiento

Se hizo una solución madre colocando 0,4 ml de la proteasa N 8000 en 100 ml de buffer acetato de pH 5,4, y de esa solución se adicionó 1ml a 200 ml de suero a idéntico pH.

– **Proteasa en polvo de Bacillus subtilis N 34500 de Ensur S.A.**

También esta proteasa fue usada con el fin de acelerar el proceso de maduración del queso Pategrás, adicionándose 0,25, 0,5 y 5 gr por cada 50 litros de leche (66). Habiéndose obtenido un buen resultado con las dos primeras concentraciones (con 5 gr/50 lt el producto resultó excesivamente amargo), para esta experiencia se adoptó la segunda concentración, es decir 0,5 gr/50 lt, o sea 0,002 gr de enzima/200 ml de suero.

Procedimiento

Se hizo una solución madre, colocando 0,2 gr en 100 ml del buffer acetato de pH 5,4, y de esa solución se adicionó 1 ml a 200 ml de suero a idéntico pH.

– Proteasa en polvo de *Aspergillus oryzae* 31000 de Miles Laboratories Inc.

Esta tercer proteasa empleada para acelerar la maduración del queso Pategrás, se usó en dos concentraciones, adicionándose 3 y 5 gr por cada 50 litros de leche (66). Teniendo en cuenta que esta segunda concentración dio lugar a un producto organolépticamente inaceptable, para esta experiencia se adoptó 3gr/50 lt, es decir 0,012 gr de enzima/200 ml de suero.

Procedimiento

Al igual que en los casos anteriores, se hizo una solución madre, colocando 1,2 gr de enzima en 100 ml del buffer acetato de pH 5,4, y de esa solución se adicionó 1 ml a 200 ml de suero a idéntico pH.

– **Testigo**

Todas las experiencias fueron acompañadas por una muestra testigo, incubada en idénticas condiciones, pero en ausencia de enzima.

b- Hidrólisis de las sueroproteínas parcialmente desnaturalizadas

En base a los resultados obtenidos en la experiencia anterior, para la hidrólisis en Dairy Lo[®], se seleccionaron enzimas representativas de distintas actividades proteolíticas: elevada, proteasa N 34500 de Ensur S.A. y pepsina porcina pura; moderada, coagulante MR 90 - A y escasa, renina bovina pura.

Para este caso se mantuvieron las mismas relaciones enzima/sustrato que para el suero isoelectrico, incubándose bajo las mismas condiciones de temperatura, tiempo y pH, a excepción de la pepsina, la cual sólo se incubó a pH 2,0.

Al igual que en el caso anterior, para cada experiencia fue incluida una muestra testigo.

c- Hidrólisis de las sueroproteínas puras

El estudio de la hidrólisis de las sueroproteínas puras se realizó únicamente en forma cualitativa, dado que estos reactivos resultan económicamente inaccesibles en cantidades que permitan realizar un fraccionamiento de nitrógeno. Por lo tanto, estos ensayos fueron realizados a escala micro, trabajando con muestras de 1 mililitro, y los resultados evaluados

mediante electroforesis, como se describe más adelante. Las condiciones de hidrólisis (relación enzima/sustrato, temperatura, pH y tiempo de incubación) fueron las mismas que en los casos anteriores, a excepción de las pepsinas bovina y porcina, las cuales se ensayaron únicamente a pH 2,0, puesto que a ese pH ya se había confirmado su fuerte actividad proteolítica.

Determinaciones analíticas

a- Evaluación cuantitativa

La hidrólisis producida en las sueroproteínas nativas y en las sueroproteínas parcialmente desnaturalizadas, fue evaluada cuantitativamente observando un esquema propuesto para el seguimiento de la maduración del queso Pategrás (70). En base a éste, se ponderaron los incrementos producidos, luego de la incubación, en las siguientes fracciones nitrogenadas:

- **Nitrógeno soluble en ácido Tricloroacético al 2% (T.C.A. 2%):**
Péptidos de peso molecular inferior a 6000.
- **Nitrógeno soluble en ácido Tricloroacético al 12% (T.C.A. 12%):**
Péptidos de peso molecular inferior a 2000.
- **Nitrógeno soluble en ácido Fosfotúngstico (P.T.A.):** Péptidos muy cortos y aminoácidos.

Para obtener los incrementos en las distintas fracciones nitrogenadas, de cada ensayo se tomaron muestras al tiempo cero, es decir en el preciso instante en que se adicionó la enzima, y a las 48 horas, o sea al final del período de incubación.

Los valores obtenidos fueron luego procesados mediante la siguiente expresión:

$$IR\% = \frac{N - N_o}{N_o} \times 100$$

Donde:

IR%: Incremento relativo porcentual

CN: Contenido de nitrógeno a las 48 hs

CNo: Contenido de nitrógeno al tiempo cero

CNt: Contenido de nitrógeno total

*** Procedimiento**

– Fraccionamiento de nitrógeno

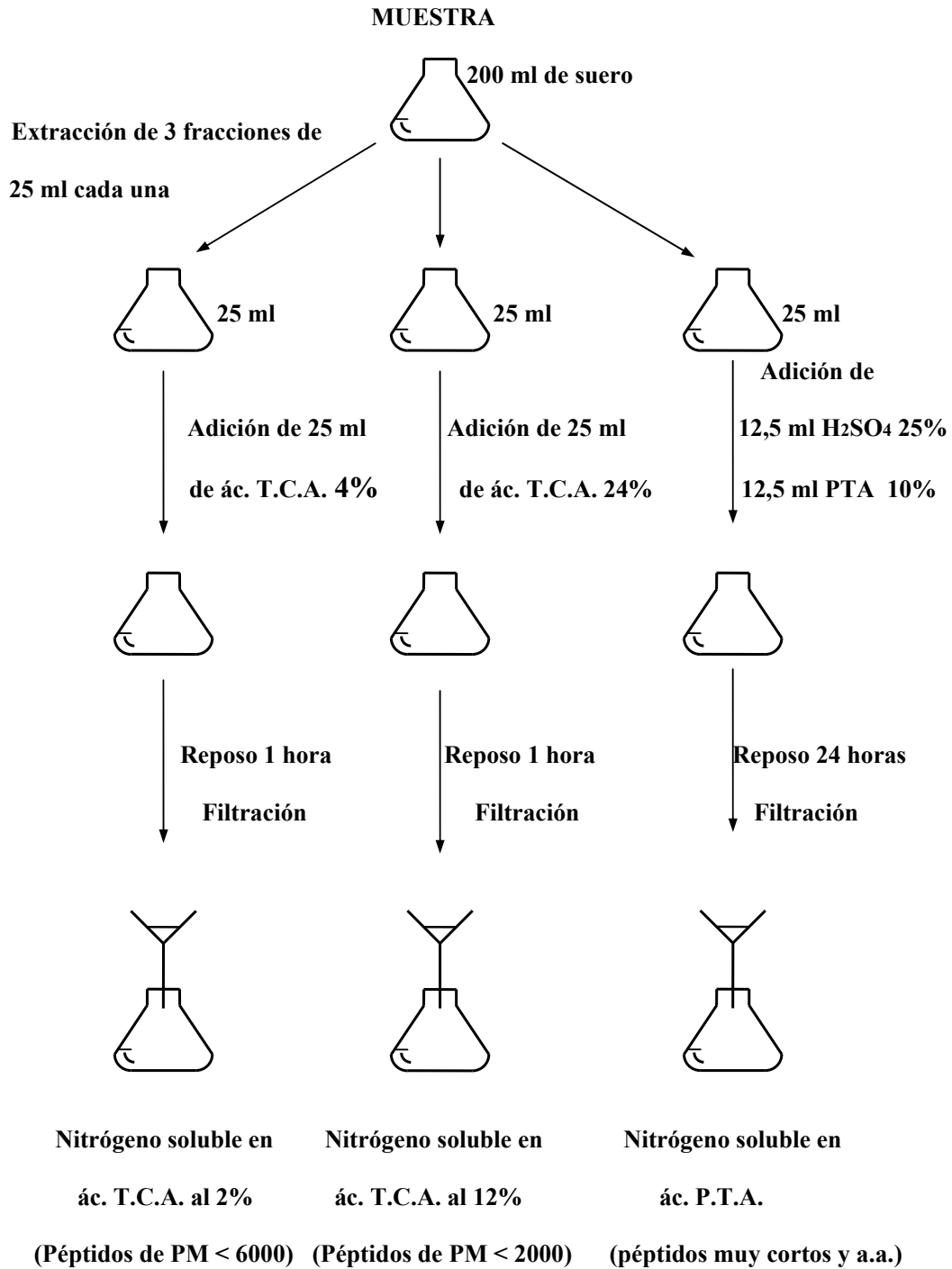
Para las fracciones nitrogenadas solubles en ácido T.C.A. al 2 y al 12%, se procedió de la siguiente manera: de cada muestra de sueroproteínas se tomaron, dos alícuotas de 25 ml las que fueron colocadas en sendos erlenmeyers. Seguidamente, se agregaron, bajo agitación, 25 ml de ác. T.C.A. al 4% (para obtener N soluble en ác. T.C.A. al 2%) en una, y 25 ml de T.C.A. al 24% (para obtener N soluble en T.C.A. al 12%) a la otra, dejándose luego en reposo durante una hora. Transcurrido dicho tiempo, las mezclas fueron filtradas a través de papel Whatman N° 42, hasta obtener un líquido translúcido. De cada filtrado se extrajo una alícuota de 25 ml, para la determinación del contenido de nitrógeno.

Para las fracciones nitrogenadas solubles en ácido fosfotúngstico, se siguió la técnica de Gripon y col. (71). De cada muestra de sueroproteínas, también se tomaron 25 ml a los cuales, una vez colocados en un erlenmeyer, se les adicionó bajo agitación, 12,5 ml de ácido sulfúrico al 25% más 12,5 ml de

ácido fosfotúngstico al 10%. La mezcla resultante fue dejada en reposo a temperatura ambiente, durante 24 horas. Transcurrido dicho tiempo, se filtró a través de papel Whatman N° 42, hasta la obtención de un líquido translúcido, del cual se extrajo una alícuota de 25 ml para la determinación el contenido de nitrógeno.

En la Figura 4, se presenta un esquema del procedimiento seguido para la obtención de las distintas fracciones nitrogenadas.

Figura 4- Esquema para el fraccionamiento del nitrógeno



– **Determinación del contenido de nitrógeno**

Todas las determinaciones de nitrógeno se realizaron mediante el método de Kjeldahl, de acuerdo a la norma FIL-IDF 20B:1993 (57), Para cada determinación se tomaron muestras de 25 ml de solución filtrada, y se digirieron en la unidad digestora descrita anteriormente (véase preparación de sueroproteínas parcialmente desnaturalizadas). La recuperación del amonio liberado tras la destilación se hizo mediante una solución de ácido bórico al 4%, sobre la cual se valoró el borato de amonio formado con una solución valorada de ácido sulfúrico 0,1 N.

Expresión del resultado

$$CN = \frac{V \times N \times 0,028}{v} \times 100$$

Donde

CN: Contenido de nitrógeno (mgr. de nitrógeno por 100 ml de muestra)

N: normalidad de la solución valorada de ácido

V: volumen gastado de la solución valorada de ácido (ml)

v: volumen de filtrado analizado (ml)

b- Evaluación cualitativa

Todos los ensayos de proteólisis fueron evaluados cualitativamente a través de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS). Mediante esta técnica, las distintas fracciones proteicas acomplejadas con el SDS, migran a través de las mallas del gel de poliacrilamida con una velocidad que es función de su masa y no de su carga total (72-73). Para este análisis se empleó una cuba electroforética modelo Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories California E.E.U.U.), para geles en placa de 7 cm de largo por 8 de ancho, con un espesor variable entre 0,5 y 1,5 mm, provista de una fuente de poder Model 1000/500 de la misma firma, que permite suministrar el voltaje constante. Las condiciones de trabajo se ajustaron a las empleadas por Schmidt y col. (55), (67) y Guo y col. (56), quienes siguen el método de Laemmli (74), con algunas modificaciones. Consecuentemente, se adoptó el sistema de gel discontinuo, constituido por el gel de apilamiento o de poro grueso (localizado en la parte superior) y gel de separación o de poro fino, cuyas concentraciones de acrilamida fueron 4% y 13% respectivamente. Ambos geles fueron preparados mezclando las soluciones stock de acrilamida y los buffers de corrida y apilamiento (los dos con SDS), en las proporciones adecuadas para lograr las concentraciones indicadas. En todos los casos, se trabajó con geles de 1 mm de espesor.

Las experiencias se desarrollaron en medio alcalino, usando el buffer de corrida tris-glicina a pH 8,3.

Las muestras se disolvieron por partes iguales en el buffer de muestra conteniendo SDS, 5% de β -mercaptoetanol, y una punta de espátula de azul de bromofenol como indicador del frente de avance. La mezcla resultante, que contenía aproximadamente 3 mg de proteína por ml de solución, fue tratada durante 5 min. a 95°C para permitir la fijación del SDS. En base a experiencias previas, se adoptó una siembra de 7 μ l por calle, en virtud de que esta cantidad proporcionó la mejor resolución.

En todos los ensayos electroforéticos fueron incluidas como patrones las sueroproteínas puras α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina de Sigma Chemical Company (S.t. Louis, M.O. U.S.A.).

Las condiciones de corrida en todos los casos fueron las siguientes: voltaje constante, 150 Volt; intensidad máxima, 45 mAmpere y potencia, 6,75 Watt. La finalización de la corrida fue determinada por la llegada del frente de avance (azul de bromofenol) al final de la placa.

La tinción de los geles se realizó colocándolos en Coomassie Brilliant Blue R - 250, en presencia de etanol y ácido acético durante una hora, y el exceso de colorante fue eluido mediante repartidos lavados con una solución decolorante constituida por ácido acético, etanol y agua.

*** Consideraciones respecto al método electroforético**

La electroforesis en gel de poliacrilamida es una excelente herramienta para la investigación e identificación de proteínas o fracciones proteicas.

Mediante esta técnica, estos compuestos pueden separarse según su carga neta (electroforesis de zona a pH alcalino), su masa (SDS-PAGE) ó su punto isoeléctrico (focalización isoeléctrica).

Para el presente trabajo se adoptó SDS-PAGE por ser una técnica que ofrece resultados altamente satisfactorios, y en virtud de lo cual es una de las más difundidas (21), (56), (67), (75).

La inclusión de urea (UREA-PAGE), fue descartada dado ésta además de no mejorar la separación de las sueroproteínas (76), se ha demostrado que para este caso puede conducir a la obtención de geles manchados que dificulten su resolución (52). A su vez, la presencia de SDS permite analizar el total de las sueroproteínas, ya que éste puede solubilizar aun aquellas que se encuentran desnaturalizadas (21).

Sin embargo, dado que ciertos autores sugieren que un gel de corrida con 10% de acrilamida y un gel de apilamiento adicionado de urea 5M, se logra una eficaz separación de las proteínas del lactosuero (77), se realizaron algunas corridas previas empleando UREA-PAGE, pero los resultados obtenidos no evidenciaron una mejor resolución.

Con respecto a las técnicas de focalización isoeléctrica, para las proteínas del lactosuero algunos investigadores han ensayado un rango de pH 3-9 (9), logrando una buena resolución, pero con una separación de bandas muy estrecha, posiblemente debido a la proximidad de sus puntos isoeléctricos.

II.2- ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN QUESOS

En base a las experiencias anteriores, se investigó si la actividad enzimática detectada in vitro sobre las sueroproteínas, también puede verificarse en el ambiente propio de un queso, y si es así, determinar su incidencia en las características del producto final. Para ello, se estudió acción de una de las proteasas más activas, en un queso enriquecido con sueroproteínas mediante el agregado de ricotta de suero.

Condiciones de trabajo

Para esta experiencia, se realizaron tres quesos: uno con adición de ricotta (experimental 1), otro con adición ricotta y la enzima en estudio (experimental 2), y un tercero convencional, es decir sin ningún agregado (testigo).

a- Selección del tipo de queso

Para esta experiencia, se eligió el queso Cremoso Argentino cuyas características se encuentran especificadas en el Código Alimentario art. 622 (78). Se trata del queso blando más popular en la Argentina, y en el que se ha puesto mayor énfasis para mejorar el rendimiento a través de la incorporación de proteínas del suero. En este sentido, nuestro laboratorio ya cuenta con antecedentes en el tema, habiéndose estudiado la influencia de distintos de aditivos (entre ellos la ricotta) sobre el rendimiento de este tipo de queso (79).

b- Elección de la proteasa

La enzima escogida para este ensayo, fue la Proteasa en polvo de *Bacillus subtilis* N 34500 de Ensur S.A., la cual además de exhibir una elevada actividad in vitro, ya había sido empleada con buenos resultados en la aceleración de la maduración del queso Pategrás Argentino (66). Teniendo en cuenta la eventual pérdida producida con el desuerado, en esta oportunidad, se adoptó una concentración de 25 mg por litro de leche, es decir algo más del doble de la empleada en las experiencias in vitro. De este modo, a la leche de elaboración de uno de los quesos con ricotta, se adicionó 1 gr de la proteasa N 34500 (previamente disuelta en una pequeña alícuota de la misma leche) inmediatamente antes de la coagulación.

c- Agregado de ricotta

Los quesos experimentales, fueron elaborados a partir de leche adicionada a razón de un 4,5% de ricotta semimagra. Esta cantidad representa aproximadamente toda la ricotta que se podría recuperar a partir del suero proveniente de la fabricación del mismo queso. Asimismo, mediante experiencias anteriores, se encontró esta proporción de ricotta en la leche de elaboración produce el mayor efecto favorable sobre las propiedades de la coagulación, sin representar una excesiva carga inerte que afecte negativamente la textura del queso.

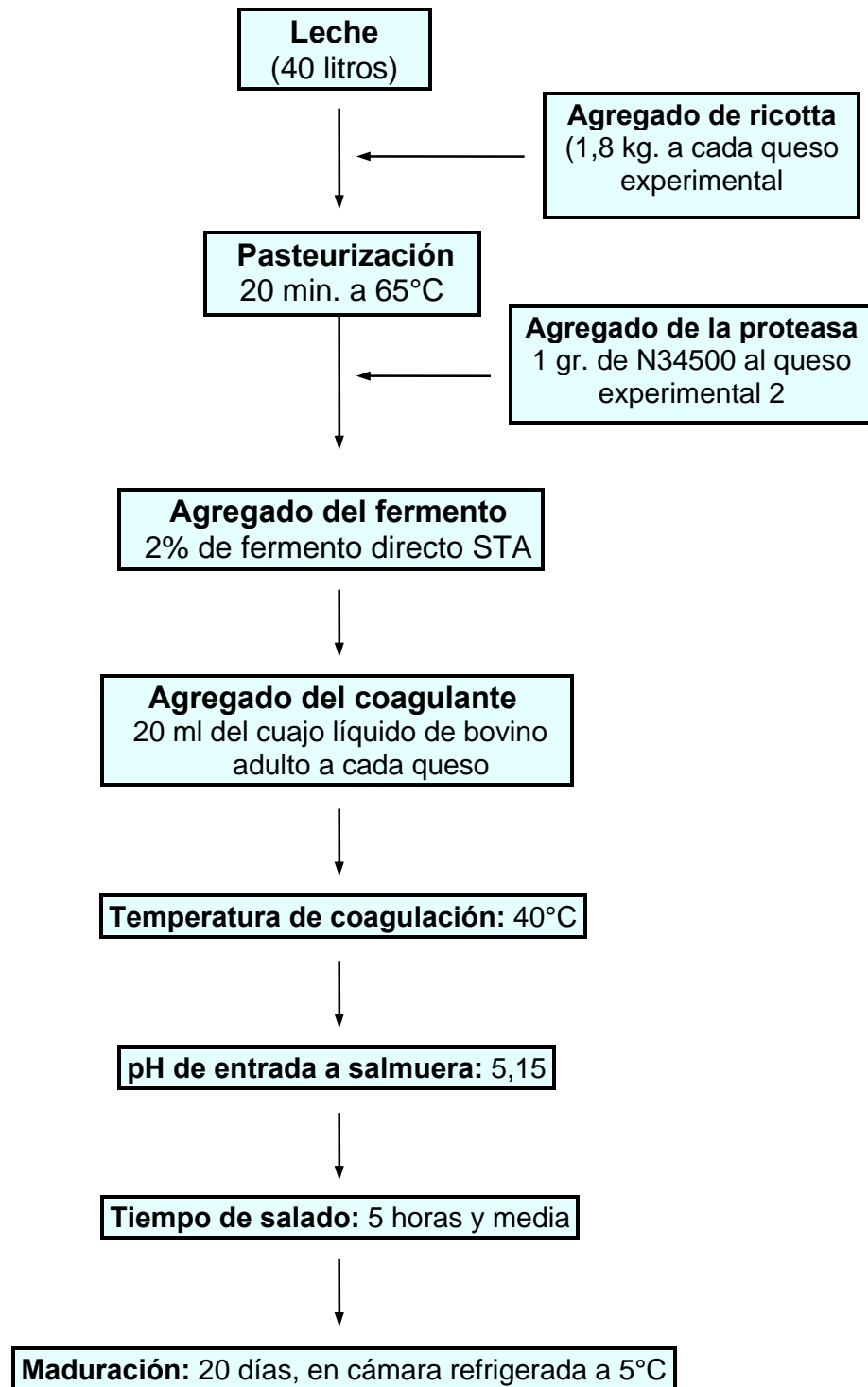
Antes de ser agregada, la ricotta fue previamente triturada (muy finamente) y posteriormente filtrada a través de un Tamiz N° 40. Luego en estas condiciones se la adicionó a la leche de elaboración de los quesos experimentales inmediatamente antes de la etapa de pasteurización.

Elaboración casearia

Tanto los quesos experimentales como el testigo, fueron hechos mediante la tecnología clásica de elaboración de queso cremoso, que se sigue a nivel industrial.

En el siguiente esquema se pueden apreciar las condiciones de trabajo:

Condiciones de la elaboración casearia



A los tres días de elaborados, todos los quesos fueron envasados en bolsas de plástico termocontraíble.

Los tres quesos fueron analizados al tiempo cero (cuajada) y a los veinte días: queso maduro.

Determinaciones analíticas

a- Determinaciones analíticas al tiempo cero (cuajada)

*** Estudio electroforético del residuo caseínico insoluble a pH 4,6**

El estudio del residuo caseínico insoluble a pH 4,6 de la cuajada, se hizo mediante electroforesis cualitativa en gel de poliacrilamida. En este caso se trabajó en presencia de urea (UREA - PAGE), dado que este agente disociante es necesario para lograr una efectiva separación de las distintas caseínas. Se siguió el método de Andrews (80) de gel discontinuo, empleando una concentración de acrilamida de 12% para el gel separador, y 4% para el gel de apilamiento. Las dimensiones de los geles, y las condiciones de corrida fueron las mismas que para las sueroproteínas.

*** Preparación de la muestra de residuo insoluble a pH 4,6**

La fracción insoluble a pH 4,6 se obtuvo siguiendo la técnica empleada por Zalazar y col. (70). Para ello se extrajo una muestra de cuajada de aproximadamente unos 10 gramos, la cual fue macerada en mortero adicionando

20 ml de solución de citrato de sodio 0,5 M, y luego agua destilada hasta completar unos 90 ml. La suspensión obtenida fue trasvasada a un vaso de precipitado y acidificada, bajo agitación, hasta pH 4,6 con ácido clorhídrico 0,1N, valor que se debió mantener constante durante al menos 10 minutos. A partir de allí, se obtuvo el residuo insoluble a pH 4,6, centrifugando a 3000 g durante 10 min., y descartando el sobrenadante.

Para la purificación de este residuo, se procedió de la siguiente manera: se lo volvió nuevamente a un vaso de precipitado, y se lo redisolvió agregando unos 200 ml de agua destilada y llevando el pH a 7 bajo agitación. Luego de ser mantenido unos 10 min. en esas condiciones, se volvió a precipitar a pH 4,6, procediéndose de igual manera que en la extracción. Esta operación fue repetida dos veces. Finalmente se hicieron dos lavados con agua destilada (por suspensión y centrifugación). Las muestras así obtenidas fueron conservadas en freezer a -18°C para su posterior análisis electroforético.

b- Determinaciones analíticas sobre el queso maduro

Sobre el queso maduro se realizaron las siguientes determinaciones:

*** Grado de maduración (GM)**

El grado o índice de maduración se determinó haciendo el cociente entre el contenido de nitrógeno soluble a pH 4,6 (fracciones de peso molecular inferior a 15000-16000) y el contenido de nitrógeno total.

O sea

$$GM = \frac{\%N_{sol \ a \ pH4,6}}{\%N_{total}}$$

*** Determinación del contenido de nitrógeno total**

El contenido total de nitrógeno se determinó analizando por Kjeldahl una muestra de queso de aproximadamente 0,25 gr (pesada exacta).

Expresión del resultado

$$\%N = \frac{V \times N \times 0,014}{m} \times 100$$

Donde

%N: es el porcentaje de nitrógeno por peso de muestra

V: volumen gastado de la solución valorada de ácido (ml)

N: Normalidad de la solución valorada de ácido

m: masa de muestra analizada (gr)

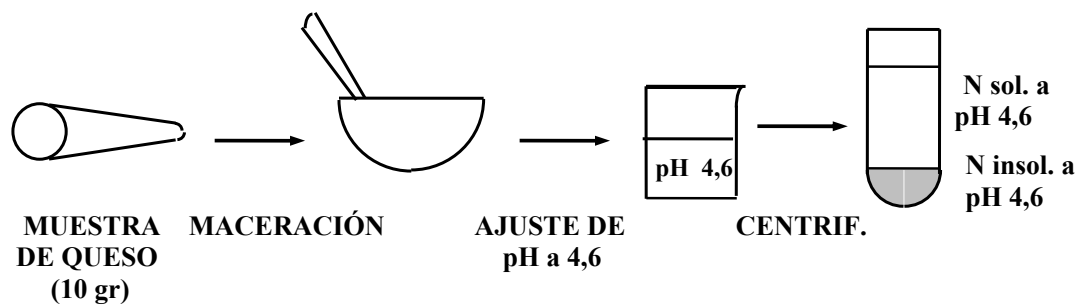
*** Determinación del contenido de nitrógeno soluble a pH 4,6**

Para esta determinación se extrajo, mediante calador, una muestra de 10 gr de queso (pesada exacta), la cual se maceró en mortero, se ajustó el pH y se centrifugó procediendo de igual manera que para la obtención del residuo

insoluble a pH 4,6. De este modo, luego de la centrifugación, se obtuvieron las dos fracciones a estudiar: nitrógeno soluble y nitrógeno insoluble a pH 4,6.

Este procedimiento, podría esquematizarse como se indica en la figura 5.

Figura 5- Obtención de fracciones nitrogenadas solubles e insolubles a pH 4,6.



Para evaluar su contenido de nitrógeno soluble a pH 4,6, se recuperó totalmente el sobrenadante y se lo llevó a 100 ml con agua destilada. Habiendo homogeneizado bien esta solución, se extrajo una alícuota de 10 ml. para ser analizada por Kjeldahl.

Expresión del resultado (Para una alícuota de digestión de 10 ml)

$$\%NS = \frac{V \times N \times 14}{m}$$

Donde

%NS: porcentaje de nitrógeno soluble a pH 4,6 por peso de muestra

V: volumen gastado de la solución valorada de ácido (ml)

N: normalidad de la solución valorada de ácido

m: masa de muestra (gr)

*** Estudio electroforético del residuo caseínico insoluble a pH 4,6**

Paralelamente a la obtención de la fracción nitrogenada soluble a pH 4,6 de los quesos maduros, también se recuperó el residuo caseínico insoluble a pH 4,6 para ser estudiado electroforéticamente. Para ello, el mismo se purificó con idéntica metodología que el de la cuajada, y luego ambos fueron conjuntamente analizados por UREA - PAGE.

*** Determinación del contenido de humedad**

El contenido de humedad de los quesos se determinó según la Norma FIL-IDF 4 A: 1982 (81). Para ello, se empleó una cápsula conteniendo unos 25 gr de arena tratada especialmente, y una varilla de vidrio. Una vez tarado este conjunto, se colocó una muestra de queso de aproximadamente 3 gr., y se determinó exactamente el nuevo peso. Luego con ayuda de la varilla, la muestra se disgregó lo mejor posible, cuidando de no perder material. Finalmente se la colocó en estufa a $102 \pm 1^{\circ}\text{C}$, hasta pesada constante, pero homogeneizando cada

tanto, para evitar la formación de una capa superficial que dificulte la remoción del agua.

Expresión del resultado

$$H\% = \frac{MSh - MSs}{MSh} \times 100$$

donde

H%: Es la humedad expresada en base húmeda

MSh: Es la masa de sólido húmedo (masa de la cápsula más la muestra antes de secar menos la tara de la cápsula más la arena y la varilla) (gr).

MSs: Es la masa de sólido seco (masa de la muestra seca menos la tara de la cápsula más la arena y la varilla) (gr).

*** Rendimiento**

El rendimiento se obtuvo mediante la pesada de los quesos, expresando el resultado como los Kg. de queso obtenidos por cada 100 lt. de leche.

*** Evaluación sensorial**

Los tres quesos fueron sometidos a un análisis sensorial llevado a cabo en el Instituto de Tecnología de Alimentos, por un panel conformado por ocho

evaluadores especialmente seleccionados y entrenados para tal fin, bajo la dirección de la Lic. Nora Sabbag.

Los atributos evaluados fueron los siguientes:

- ◇ **Aroma:** característico, genuino, a crema
- ◇ **Color:** blanco cremoso, blanco neutro
- ◇ **Textura:** compacta - no desgranable, ciega - sin agujeros, elástica, cremosa y suave al paladar, algo pastosa, no pegajosa.
- ◇ **Sabor:** ligeramente salado, a crema.

Las muestras, fueron identificadas con números aleatorios de tres dígitos.

La evaluación tuvo lugar en una sala ambientada a tal efecto, en la cual las muestras fueron presentadas en bandejas individuales.

A cada muestra se asignó un puntaje, utilizando escalas de 1 a 5 para aroma color y sabor, y de 1 a 10 para textura. Se realizaron dos evaluaciones con un intervalo de 30 minutos entre ambas.

Los datos obtenidos a partir de la evaluación sensorial fueron procesados estadísticamente aplicando Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía.

III- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1- RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS ENSAYOS IN VITRO

A continuación se presentan los resultados obtenidos a partir de las experiencias in vitro, ordenados en base a los distintos sustratos estudiados, conjuntamente con los análisis y las críticas pertinentes.

Ensayos sobre suero isoelectrico

Para obtener los incrementos relativos en las distintas fracciones nitrogenadas, entre el tiempo cero y el final del período de incubación, según la ecuación $IR\% = \frac{N - N_0}{N_0} \times 100$ (indicada en materiales y métodos, pág. 77), en primer lugar se evaluó la cantidad total de nitrógeno presente en el suero isoelectrico. Esto se hizo mediante el procesamiento por Kjeldahl de 11 muestras de suero isoelectrico testigo, las cuales arrojaron los valores que se presentan en la Tabla III.

Tabla III: Contenido de nitrógeno total en suero isoeléctrico expresado como mg N/100 ml de suero.

N° de muestra	Contenido de nitrógeno
1	112,29
2	109,71
3	114,42
4	112,85
5	115,01
6	111,63
7	114,48
8	113,41
9	112,57
10	113,88
11	110,93
Promedio	112,83 ± 1,63*

* Desviación estándar

Una vez obtenido el contenido de nitrógeno total (promedio) para el suero isoelectrico, para tener una referencia, sobre las mismas muestras, se determinaron los incrementos relativos para las fracciones de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético 2% y 12% y en ácido fosfotúngstico.

En la Tabla IV, se presentan los correspondientes valores de los incrementos relativos porcentuales (IR%), obtenidos para cada fracción nitrogenada.

Tabla IV: Incrementos relativos porcentuales para el nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 2% y 12% y en ácido fosfotungstico, para las muestras testigo de suero isoeléctrico.

Fracción nitrogenada Nº de muestra	Incremento Relativo (%) en Nitrógeno soluble en ác. TCA 2%	Incremento Relativo (%) en Nitrógeno soluble en ác. TCA 12%	Incremento Relativo (%) en Nitrógeno soluble en PTA
1	0,20	1,10	1,05
2	0,15	1,22	1,01
3	0,40	1,20	1,04
4	0,10	1,23	1,06
5	0,15	1,25	1,05
6	0,20	1,18	1,03
7	0,15	1,20	1,04
8	0,14	1,22	1,05
9	0,12	1,19	1,02
10	0,15	1,21	1,06
11	0,15	1,20	1,05
Promedio	0,174 ± 0,081*	1,20 ± 0,038*	1,042 ± 0,016*

* Desviación estándar

Finalmente, se calcularon los incrementos relativos para las tres fracciones nitrogenadas producidos en el suero isoeléctrico por las distintas enzimas ensayadas.

a- Resultados obtenidos para las enzimas coagulantes puras

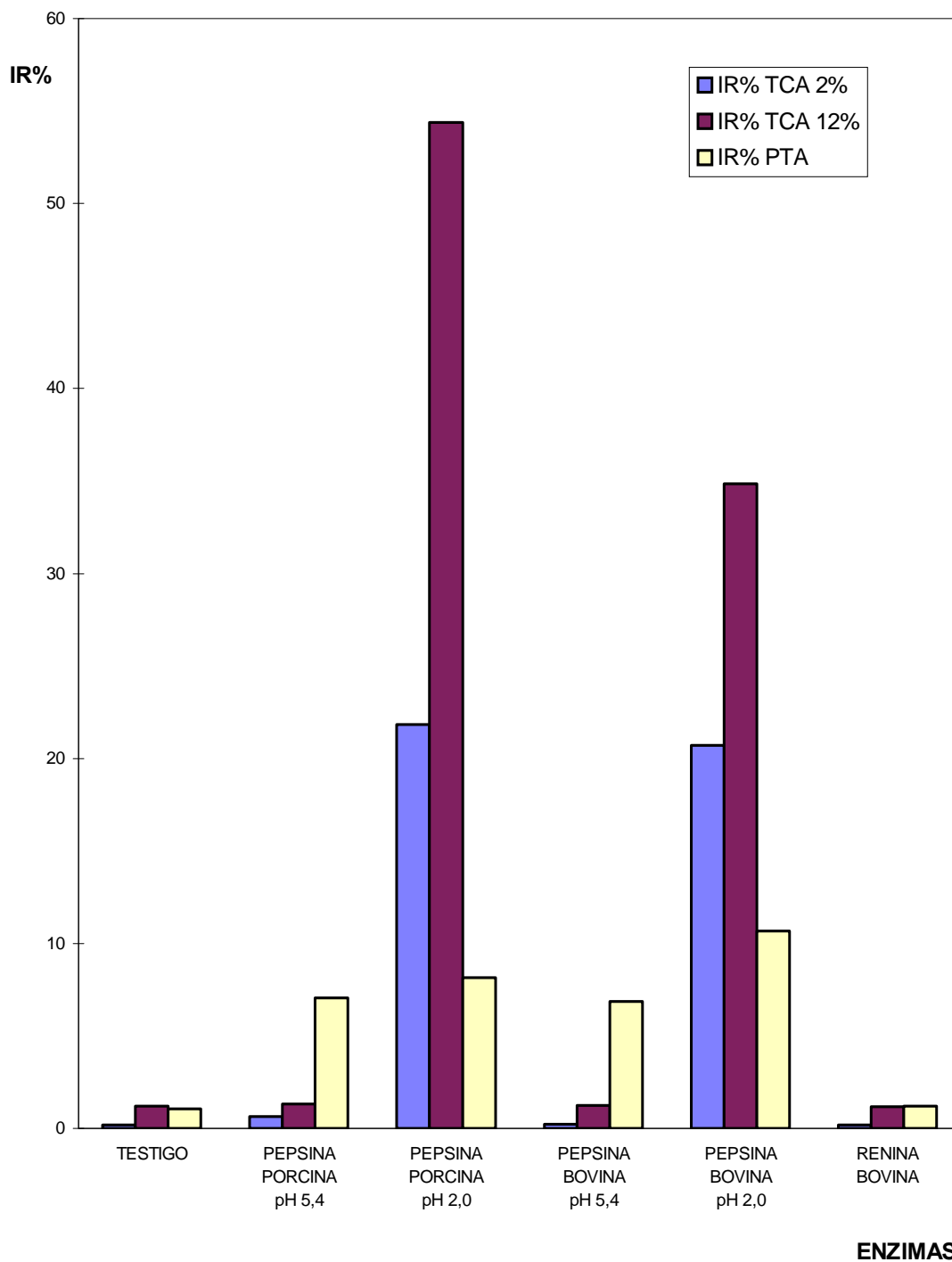
En la Tabla V se presentan los valores de los incrementos relativos porcentuales (IR%) para el nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 2% y 12% y en ácido fosfotúngstico, obtenidos para a las enzimas coagulantes puras. En la misma se incluyen los promedios correspondientes a las muestras testigo.

Tabla V: Incremento relativo porcentual para el nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 2% y 12%, y en ácido fosfotúngstico para suero isoeléctrico incubado con enzimas coagulantes puras.

Fracción nitrogenada Enzima	Incremento Relativo (%) en Nitrógeno soluble en ác. TCA 2%	Incremento Relativo (%) en Nitrógeno soluble en ác. TCA 12%	Incremento Relativo (%) en Nitrógeno soluble en PTA
TESTIGO	0,174	1,20	1,042
PEPSINA PORCINA PURA Chr.HANSEN pH 5,4	0,65	1,32	7,05
PEPSINA PORCINA PURA Chr.HANSEN pH 2,0	21,85	54,39	8,13
PEPSINA BOVINA PURA Chr.HANSEN pH 5,4	0,21	1,25	6,85
PEPSINA BOVINA PURA Chr.HANSEN pH 2,0	20,96	34,86	10,68
RENINA BOVINA PURA Chr.HANSEN pH 5,4	0,17	1,21	1,19

En la Figura 6, se puede apreciar el correspondiente diagrama de barras

Figura 6: INCREMENTO RELATIVO PORCENTUAL PARA NITRÓGENO SOLUBLE EN T.C.A. AL 2% Y 12%, Y EN P.T.A. PARA SUERO ISOELÉCTRICO INCUBADO CON ENZIMAS COAGULANTES PURAS



Los incrementos relativos de nitrógeno soluble, obtenidos para las enzimas coagulantes puras, trabajando a pH 5,4, revelan en general una pobre actividad proteolítica. En el caso particular de las pepsinas, se puede observar que el mayor incremento se produce en las fracciones nitrogenadas solubles en P.T.A. (7,05 y 6,85 para las pepsinas porcina y bovina respectivamente). Teniendo en cuenta que los valores de las fracciones nitrogenadas solubles en T.C.A. 2% y 12% no son sensiblemente mayores a los del testigo, podría suponerse que estas enzimas producen una acción superficial que conduce a la formación de péptidos muy cortos y aminoácidos.

Por el contrario, cuando la hidrólisis se lleva a cabo a pH 2,0 (óptimo para las pepsinas), se verifica una profunda proteólisis, que eleva notablemente los valores de las tres fracciones nitrogenadas. Los ensayos cualitativos, a través de los electroforetogramas, Figuras 7 y 8, han demostrado que esta acción está dirigida fundamentalmente hacia la **α -lactoalbúmina**, dado que la **β -lactoglobulina** ha evidenciado una tenaz resistencia a ser hidrolizada por estas enzimas. Esto está de acuerdo con los resultados alcanzados por diversos autores (25), (55-56), (67), quienes sostienen que la pepsina hidroliza la suero proteína mayoritaria únicamente cuando ésta ha sido previamente tratada a más de 80°C, o bien cuando la reacción se lleva a cabo en un medio etanólico superior al 25% (82). En ambos casos, se produce una desnaturalización que da lugar a cambios conformacionales en la molécula que conducen a la exposición de sitios específicos de ataque que la vuelven susceptible a la acción de la enzima.

Asimismo, en la calle 8 de la Figura 7, se puede observar que las bandas correspondiente a las **inmunoglobulinas** y a la **seroalbúmina**, a pH 2,0, desaparecen completamente al final del período de incubación, lo cual está indicando que estas proteínas también resultan sensibles a la acción de la pepsina porcina.

En el electroforetograma de la pepsina bovina (Figura 8), este efecto resulta más difuso, no obstante se puede ver que la calle 8, correspondiente a las 48 horas de incubación de dicha enzima, aparece más limpia, con una evidente desaparición de la seroalbúmina.

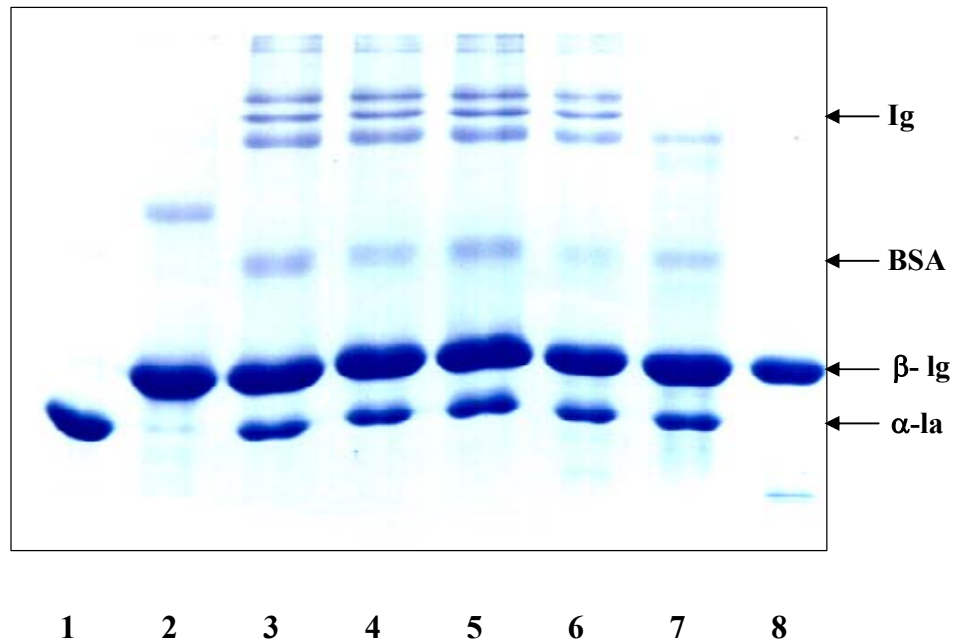


Figura 7: Electroforetograma (SDS-PAGE) correspondiente al ensayo con pepsina porcina.

1: α -la pura - 2: β -Ig pura - 3: Suero testigo al tiempo cero - 4: Suero testigo a las 48 horas - 5: Suero más pepsina porcina a pH 5,4, tiempo cero - 6: Suero más pepsina porcina a pH 5,4, a las 48 horas - 7: Suero más pepsina porcina a pH 2,0, al tiempo cero - 8: Suero más pepsina porcina a pH 2,0, a las 48 horas.

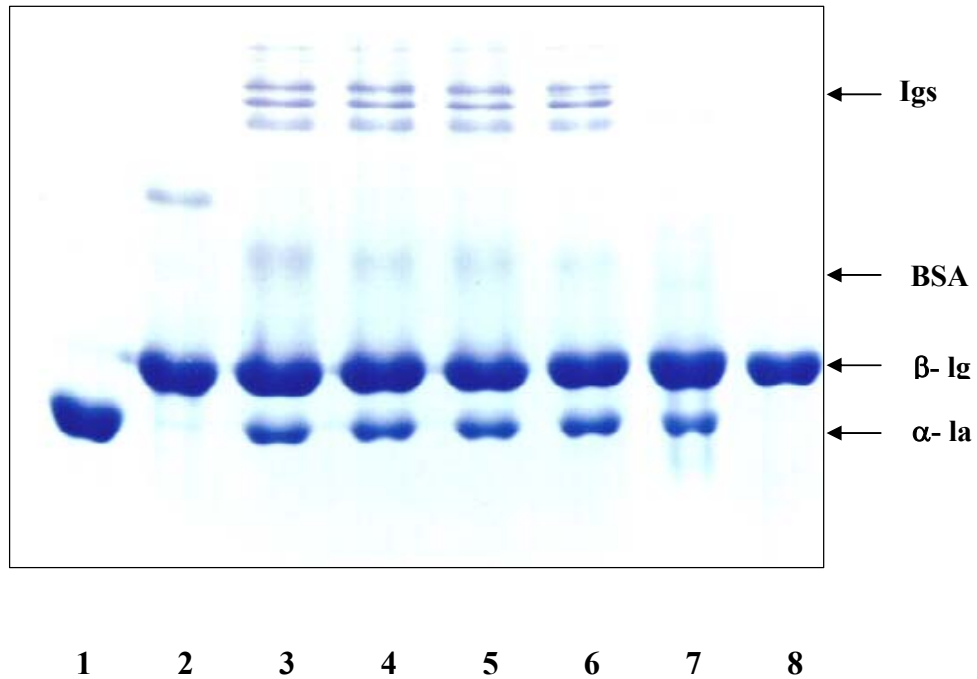


Figura 8: Electroforetograma (SDS-PAGE) correspondiente al ensayo con pepsina bovina.

1: α -la pura - **2:** β -lg pura - **3:** Suero testigo al tiempo cero - **4:** Suero testigo, a las 48 horas - **5:** Suero más pepsina bovina a pH 5,4, tiempo cero - **6:** Suero más pepsina bovina a pH 5,4, a las 48 horas - **7:** Suero más pepsina bovina a pH 2,0, al tiempo cero - **8:** Suero más pepsina bovina a pH 2,0, a las 48 horas.

En cuanto a la renina, se puede apreciar que ésta produce sólo un muy ligero incremento en la fracción nitrogenada soluble en PTA. También en este caso la bibliografía ha sindicado a la **α -lactoalbúmina** como la suero proteína susceptible a esta enzima (67), (83). Sin embargo, siendo esta acción tan sutil, no llega a detectarse electroforéticamente (ver Figura 9).

No obstante, teniendo en cuenta que R. Jost y col. (51), trabajando con renina, a pH 6,2 no detectaron evidencias de hidrólisis sobre **α -lactoalbúmina**, podría suponerse que esta acción es afectada por el pH del medio.

Por otro lado, estos investigadores trabajando a pH 4,5, encontraron que esta enzima produjo una profunda hidrólisis de la **seroalbúmina**. Este resultado fue coincidente el obtenido en esta experiencia, como se puede apreciar en la calle 6 del electroforetograma de la Fig. 9, donde se nota un ligero aclaramiento de la banda correspondiente a esta enzima.

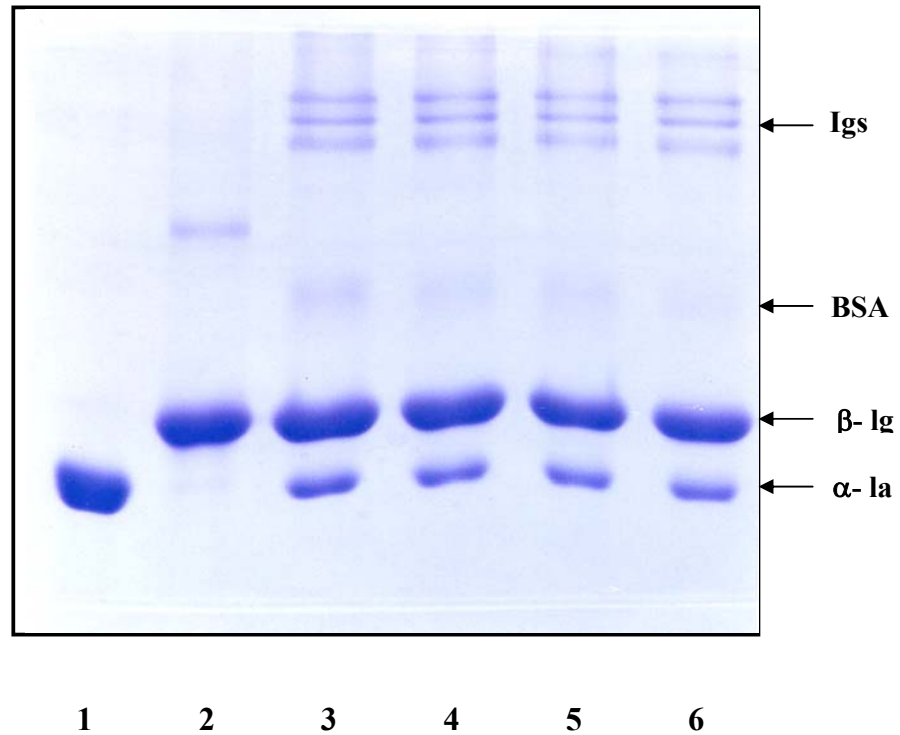


Figura 9: Electroforetograma (SDS-PAGE) correspondiente al ensayo con renina bovina.

1: α -la pura - **2:** β -lg pura - **3:** Suero testigo al tiempo cero - **4:** Suero testigo, a las 48 horas - **5:** Suero más renina bovina al, tiempo cero - **6:** Suero más renina bovina a las 48 horas.

b- Resultados obtenidos para mezclas comerciales de enzimas coagulantes

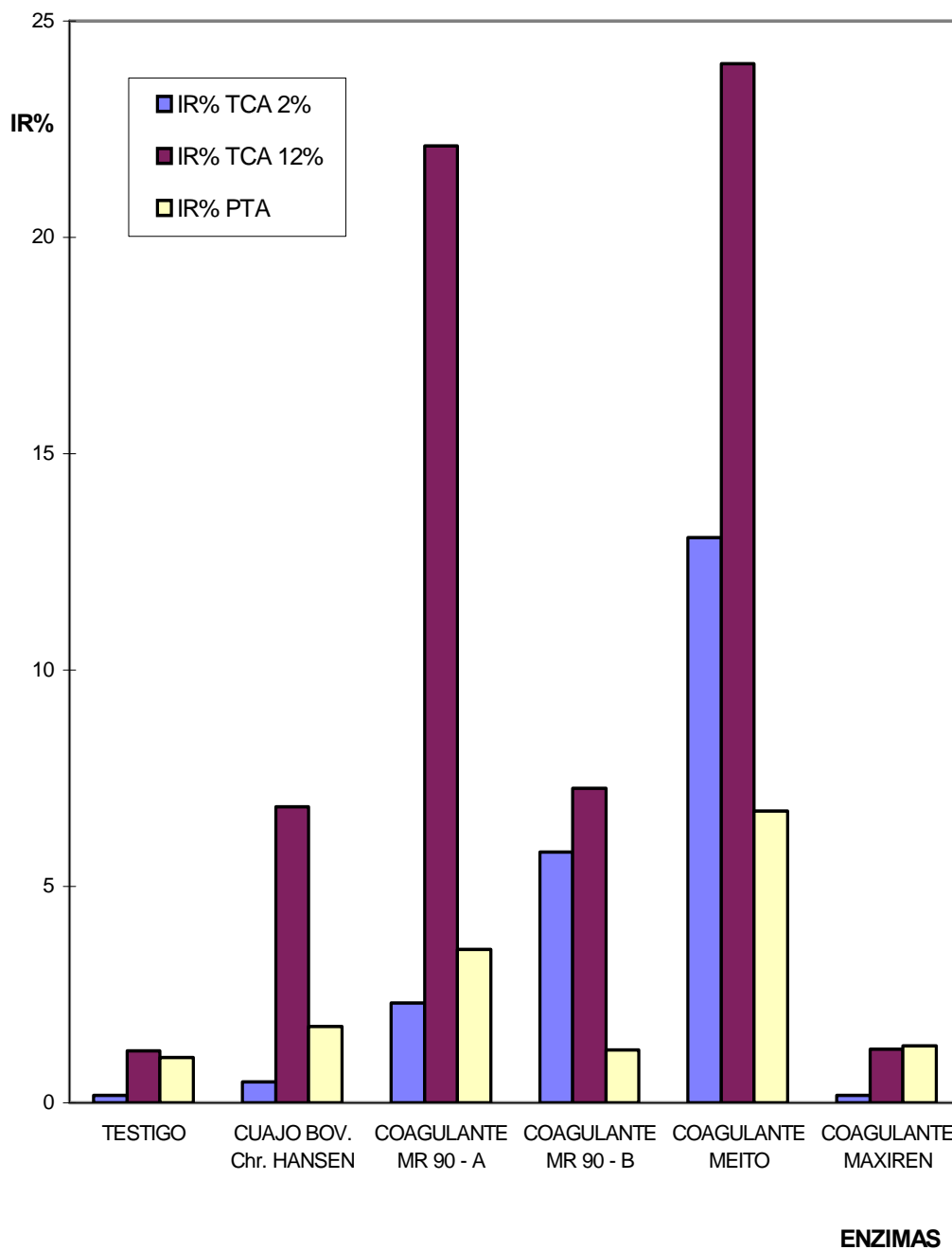
A continuación se presentan los resultados obtenidos luego de incubar el suero isoeléctrico con las enzimas coagulantes comerciales. Empleando el mismo procedimiento que en el caso anterior, se determinaron los incrementos relativos para las tres fracciones nitrogenadas, cuyos valores se presentan en la Tabla VI.

Tabla VI: Incremento relativo porcentual para nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 2% y 12%, y en ácido fosfotúngstico para suero isoeléctrico incubado con mezclas comerciales de enzimas coagulantes.

Fracción nitrogenada Enzima	Incremento Relativo (%) en Nitrógeno soluble en ác. TCA 2%	Incremento Relativo (%) en Nitrógeno soluble en ác. TCA 12%	Incremento Relativo (%) en Nitrógeno soluble en PTA
TESTIGO	0,174	1,20	1,042
CUAJO BOVINO LIQUIDO Chr. HANSEN	0,48	6,84	1,76
COAGULANTE MR 90 - A SOLVAY ENZ.	2,31	22,12	3,54
COAGULANTE MR 90 - B SOLVAY ENZ.	5,79	7,27	1,22
COAGULANTE EN POLVO MEITO	13,06	24,01	6,74
COAGULANTE MAXIREN GIST-BROCADES	0,18	1,25	1,31

En la Figura 10 se puede apreciar el correspondiente diagrama de barras

Figura 10: INCREMENTO RELATIVO PORCENTUAL PARA EL NITRÓGENO SOLUBLE EN T.C.A. 2% Y 12%, Y EN P.T.A. PARA SUERO ISOELÉCTRICO INCUBADO CON MEZCLAS COMERCIALES DE ENZIMAS COAGULANTES



En base a estos resultados, puede verse que el coagulante en polvo MEITO (*Mucor pusillus*), resultó ser el más proteolítico de los cinco coagulantes comerciales ensayados. Esta enzima produjo los incrementos relativos más elevados para todas las fracciones nitrogenadas, en especial para el nitrógeno soluble en TCA al 2% (13,06%) y en TCA al 12% (24,01). En el análisis electroforético, esta acción se manifiesta con la aparición de una nueva banda cuya movilidad resulta superior a la de la α -lactoalbúmina, tal como puede apreciarse en la Figura 11 (calle 8). El posterior estudio realizado sobre las sueroproteínas puras, indica que aparentemente, la principal actividad de este coagulante estaría dirigida hacia la β -lactoglobulina.

Por otro lado, el coagulante MR 90 -A (*Mucor miehei*), también exhibió una importante actividad proteolítica, incrementando principalmente la fracción de nitrógeno soluble en TCA al 12% (22,12%). Al igual que en el caso del coagulante MEITO, la actividad del MR 90 - A, da lugar a un producto de degradación que se manifiesta como una nueva banda en la calle 6 de la Figura 11. Análogamente, a través del análisis de las sueroproteínas puras, se puede ver con mayor claridad, que la proteína más sensible a este coagulante es también la β -lactoglobulina. No obstante, Ortiz De Apodaca y col. (83), estudiando la acción de una proteinasa ácida de *Mucor miehei* sobre suero isoeléctrico, si bien encuentran un ligero incremento en la fracción nitrogenada soluble en TCA al 12% (determinada espectrofotométricamente), no llegan a detectarlo por SDS-PAGE.

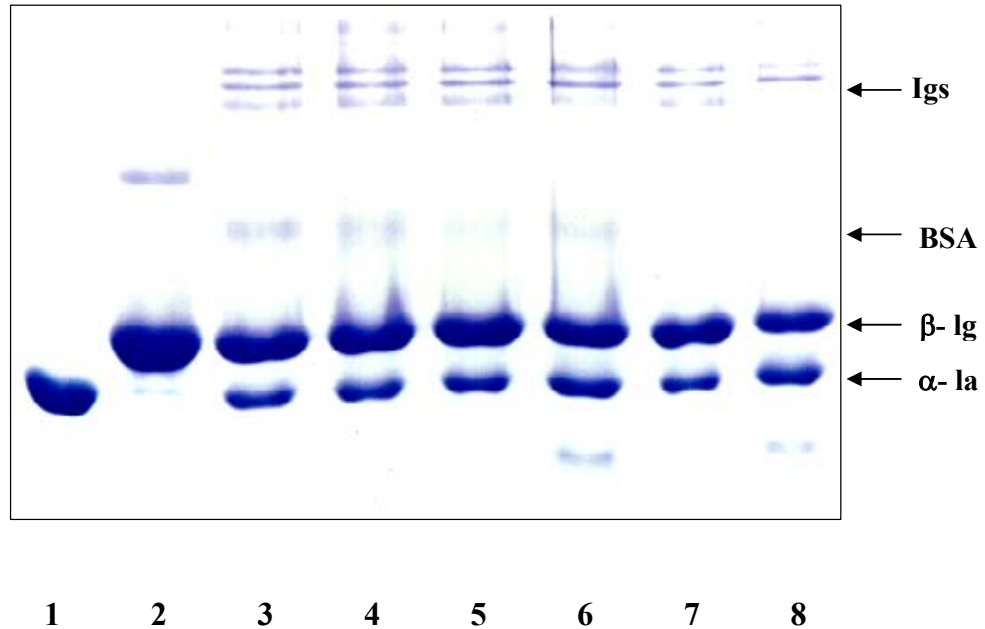


Figura 11: Electroforetograma (SDS-PAGE) correspondiente al ensayo con enzimas coagulante comerciales.

1: α -la pura - **2:** β -lg pura - **3:** Suero testigo al tiempo cero - **4:** Suero testigo a las 48 horas - **5:** Suero más coagulante MR 90-A, tiempo cero - **6:** Suero más coagulante MR 90-A, a las 48 horas - **7:** Suero más coagulante MEITO, al tiempo cero - **8:** Suero más coagulante MEITO, a las 48 horas.

Esta diferencia posiblemente se deba a que estos autores trabajan con una menor relación enzima/sustrato, dado que producen la coagulación de la leche estandarizando un tiempo normal de 6 ± 1 minutos (en esta experiencia se triplicó esa cantidad). Luego separando el coágulo por centrifugación, incuban el suero con el coagulante remanente por período de 24 en lugar de 48 horas.

Por otro lado, resulta interesante destacar la diferencia de comportamiento entre los coagulantes MR 90-A y MR 90-B. Si bien ambos tienen el mismo origen, este último exhibió sólo una modesta actividad proteolítica, superando al primero únicamente en la fracción nitrogenada soluble en TCA al 2%. La razón de esta discrepancia debería buscarse en el método de obtención que termosensibiliza al segundo y que posiblemente altere su potencial proteolítico.

Como resultado de la actividad hidrolítica de este coagulante, se produce un producto de demolición, que aparece como una delgada banda en la calle 8 del correspondiente electroforetograma, presentado en la Figura 12.

Con respecto al coagulante Maxiren (*Kluyveromyces lactis*), puede verse que resultó prácticamente inactivo para todas las fracciones nitrogenadas, lo cual coincide con los resultados logrados por los autores mencionados anteriormente (83). El comportamiento de este coagulante es una confirmación de la similitud existente entre las reninas de origen bovino y las producidas por fermentación de *Kluyveromyces lactis* modificada genéticamente, dado que ambas exhibieron prácticamente el mismo perfil hidrolítico (ver Tabla V).

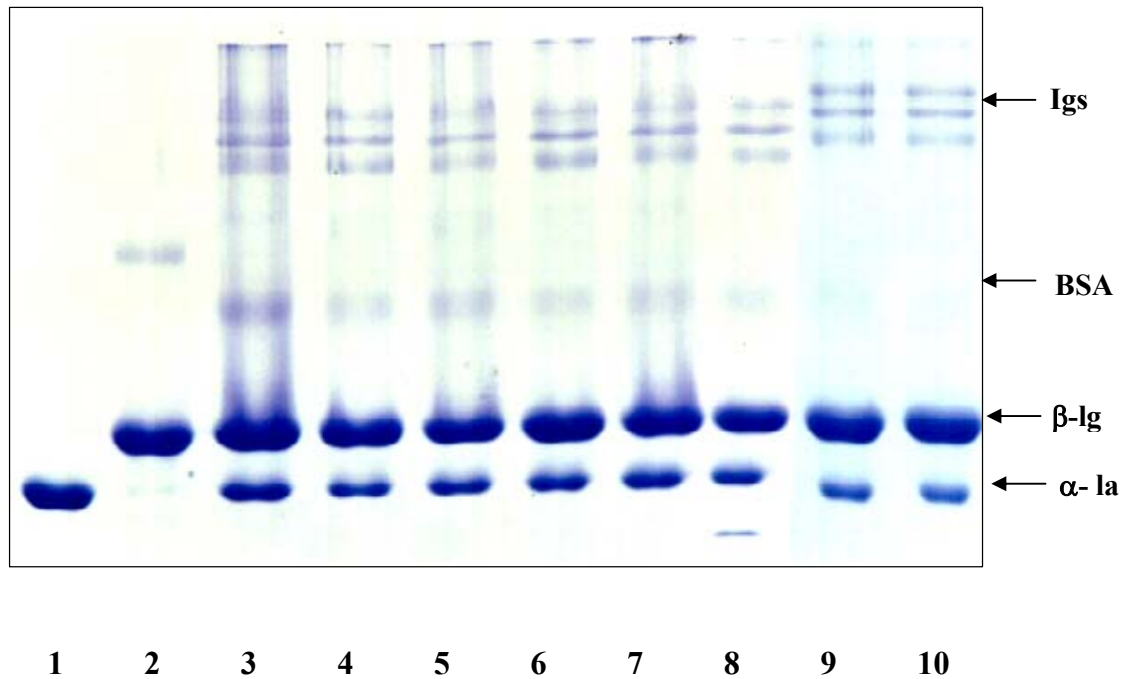


Figura 12: Electroforetograma (SDS-PAGE) correspondiente al ensayo con enzimas coagulantes comerciales.

1: α -la pura - **2:** β -Ig pura - **3:** Suero testigo al tiempo cero - **4:** Suero testigo a las 48 horas - **5:** Suero más Cuajo bovino líquido, al tiempo cero - **6:** Suero más Cuajo bovino líquido, a las 48 horas - **7:** Suero más coagulante MR 90-B, al tiempo cero - **8:** Suero más coagulante MR 90-B, a las 48 horas - **9:** Suero más coagulante MAXIREN, al tiempo cero - **10:** Suero más coagulante MAXIREN, a las 48 horas.

Finalmente, el cuajo líquido de bovino adulto, sólo produjo un ligero incremento en la fracción nitrogenada soluble en TCA, pero que no llega a detectarse a través del análisis electroforético (calle 6, Figura 12)

c- Resultados obtenidos para las enzimas proteolíticas comerciales

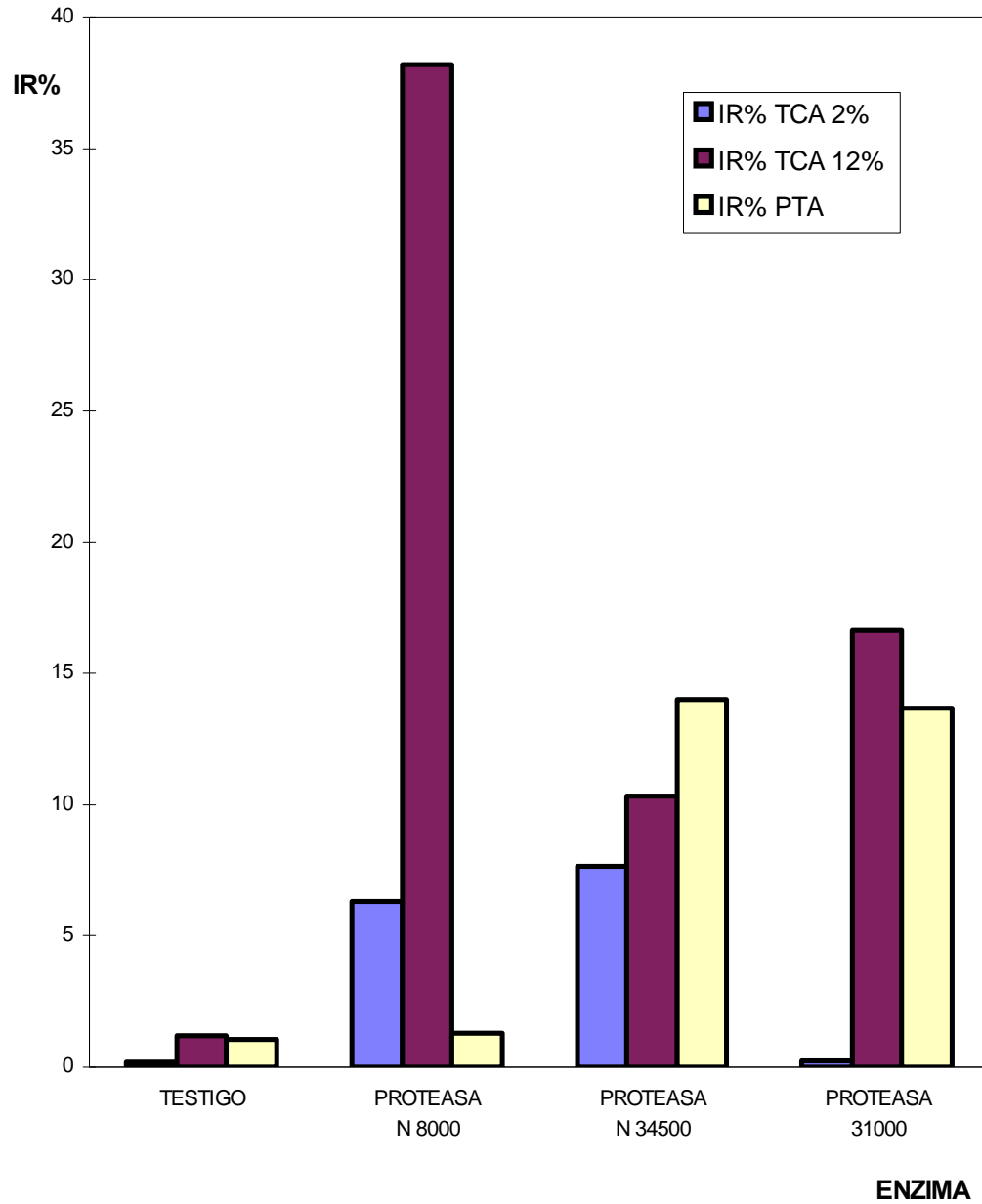
Como ya se mencionó, el tercer sistema enzimático ensayado sobre el suero isoeléctrico fueron las enzimas proteolíticas comerciales, cuyos resultados se presentan en la Tabla VII, donde se pueden apreciar los incrementos producidos en las tres fracciones nitrogenadas estudiadas.

Tabla VII: Incremento relativo porcentual para el nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 2% y 12%, y en ácido fosfotúngstico para suero isoeléctrico incubado con enzimas proteolíticas comerciales.

Fracción nitrogenada Enzima	Incremento Relativo (%) en Nitrógeno soluble en ác. TCA 2%	Incremento Relativo (%) en Nitrógeno soluble en ác. TCA 12%	Incremento Relativo (%) en Nitrógeno soluble en PTA
TESTIGO	0,174	1,20	1,042
PROTEASA LIQUIDA N 8000 - ENSUR	6,32	38,17	1,28
PROTEASA EN POLVO N 34500 - ENSUR	7,63	10,32	13,99
PROTEASA EN POLVO 31000 - MILES	0,22	16,64	13,69

En la Figura 13 se puede apreciar el correspondiente diagrama de barras

Figura 13: INCREMENTO RELATIVO PORCENTUAL PARA EL NITRÓGENO SOLUBLE EN T.C.A. 2% Y 12%, Y EN P.T.A. PARA SUERO ISOELÉCTRICO INCUBADO CON ENZIMAS PROTEOLÍTICAS COMERCIALES



A través de estos resultados, puede verse claramente que estas proteasas comerciales resultaron, sumamente activas. Sin embargo, las tres exhibieron un perfil de hidrólisis diferente, por cuanto incrementaron en distinta proporción las tres formas de nitrógeno evaluadas. Esta diferencia de actividad hidrolítica, resulta particularmente interesante en el caso de la proteasa líquida N 8000 y de la proteasa en polvo N 34500. En efecto, si bien ambas provienen de *Bacillus subtilis*, la primera produjo un sensible incremento en la fracción nitrogenada soluble en TCA Al 12% (38,17%), mientras que la segunda lo hizo en la fracción soluble en PTA (13,99%). En base a ello, puede inferirse que la proteasa en polvo N 34500 tiene una acción más intensa, llevando la proteólisis hasta péptidos muy pequeños y aminoácidos. Esto concuerda con los resultados alcanzados por Z. Y. Ju y col. (42), y por D. G. Schmidt y col. (67), quienes trabajando con proteasas de *Bacillus subtilis* sobre un aislado de sueroproteínas y sobre sueroproteínas nativas respectivamente, obtuvieron un gran número de péptidos muy cortos y aminoácidos, que no pudieron ser detectados por SDS-PAGE. Sin embargo estos autores alcanzaron mayores grados de hidrólisis, lo que posiblemente se deba a que trabajaron a un pH más elevado (7,0 y 8,0), probablemente más próximo al óptimo de la enzima, ya que esta reacción no parece ser afectada por la relación enzima/sustrato. De hecho, Schmidt (67) obtiene los mismos resultados tanto para una relación enzima/sustrato de 1:100 como con 1/1000 (en el presente trabajo se adoptó 1/300).

Con respecto a las sueroproteínas mayoritarias, el análisis electroforético (ver Figura 14) indica que si bien tanto la **α -lactoalbúmina** como la **β -lactoglobulina** fueron sensibles a las proteasas de *Bacillus subtilis*, el principal efecto recayó sobre la segunda. Este hecho fue más evidente para el caso de la proteasa N 8000, calle 6, Figura 14.

Por último, con respecto a la proteasa de Miles 31000 (*A. oryzae*), se podría decir que esta enzima produjo una hidrólisis más bien superficial, que condujo a un importante incremento en las fracciones nitrogenadas solubles en TCA al 12% y en PTA, manteniendo aproximadamente constante el nitrógeno soluble en TCA al 2%. Dicha acción es dirigida esencialmente hacia la **β -lactoglobulina**, como se puede apreciar en electroforetograma de la Figura 14 (calle 10), y se verifica mejor en los ensayos con las proteínas puras, como se verá más adelante. Análogamente, M. Britten y col. (45), trabajando con una proteasa de *A. oryzae*, encontraron que tanto la **α -lactoalbúmina**, como la **seroalbúmina** resultaron resistentes, mientras que la **β -lactoglobulina** fue sensiblemente atacada.

En la Figura 14, se presenta el electroforetograma correspondiente a esta experiencia.

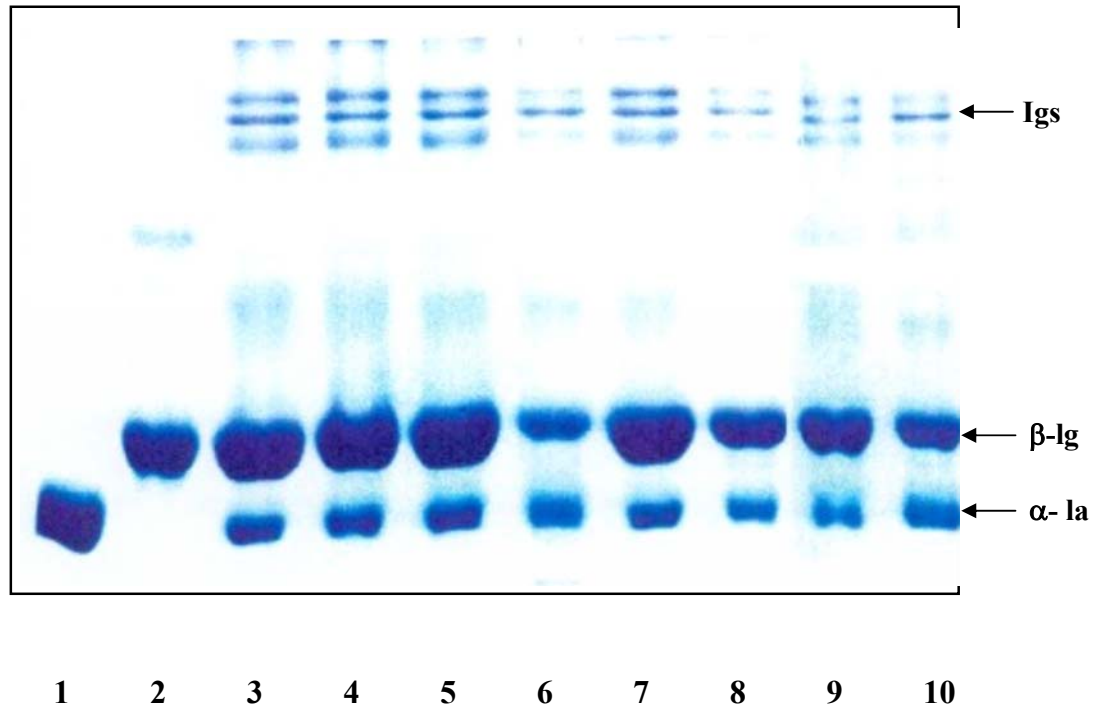


Figura 14: Electroforetograma (SDS-PAGE) correspondiente al ensayo con enzimas proteolíticas comerciales.

1: α -la pura - **2:** β -Ig pura - **3:** Suero testigo al tiempo cero - **4:** Suero testigo a las 48 horas - **5:** Suero más proteasa N 8000, al tiempo cero - **6:** Suero más proteasa N 8000, a las 48 horas - **7:** Suero más proteasa N 34500, al tiempo cero - **8:** Suero más proteasa N 34500, a las 48 horas - **9:** Suero más proteasa N 31000 de Miles, al tiempo cero - **10:** Suero más proteasa N 31000 de Miles, a las 48 horas.

Ensayos sobre sueroproteínas parcialmente desnaturalizadas

Como ya se mencionó, el segundo sustrato estudiado correspondió a las sueroproteínas parcialmente desnaturalizadas, preparado en base a Dairy Lo[®].

Del mismo modo que para las sueroproteínas nativas, para obtener los incrementos relativos en las distintas fracciones nitrogenadas, entre el tiempo cero y el final del período de incubación, según la ecuación $IR\% = \frac{N - N_0}{N_0} \times 100$ (indicada en materiales y métodos, pág. 77), en primer lugar se evaluó la cantidad total de nitrógeno presente en la solución de Dairy Lo[®]. Esto se hizo a partir de las cuatro soluciones de Dairy Lo[®] preparadas para esta experiencia, las que procesadas mediante el método de Kjeldahl, arrojaron los valores que se presentan en la Tabla VIII.

Tabla VIII: Contenido de nitrógeno total en las soluciones de Dairy Lo[®], expresado como mg N/100 ml de suero.

N° de muestra	Contenido de nitrógeno
1	94,12
2	93,86
3	94,52
4	93,78
Promedio	94,07 ± 0,33*

* Desviación estándar

Para las muestras testigo de Dairy Lo[®], luego de la incubación, mediante el método de Kjeldahl, no se llegaron a detectar incrementos en ninguna de las tres fracciones nitrogenadas estudiadas.

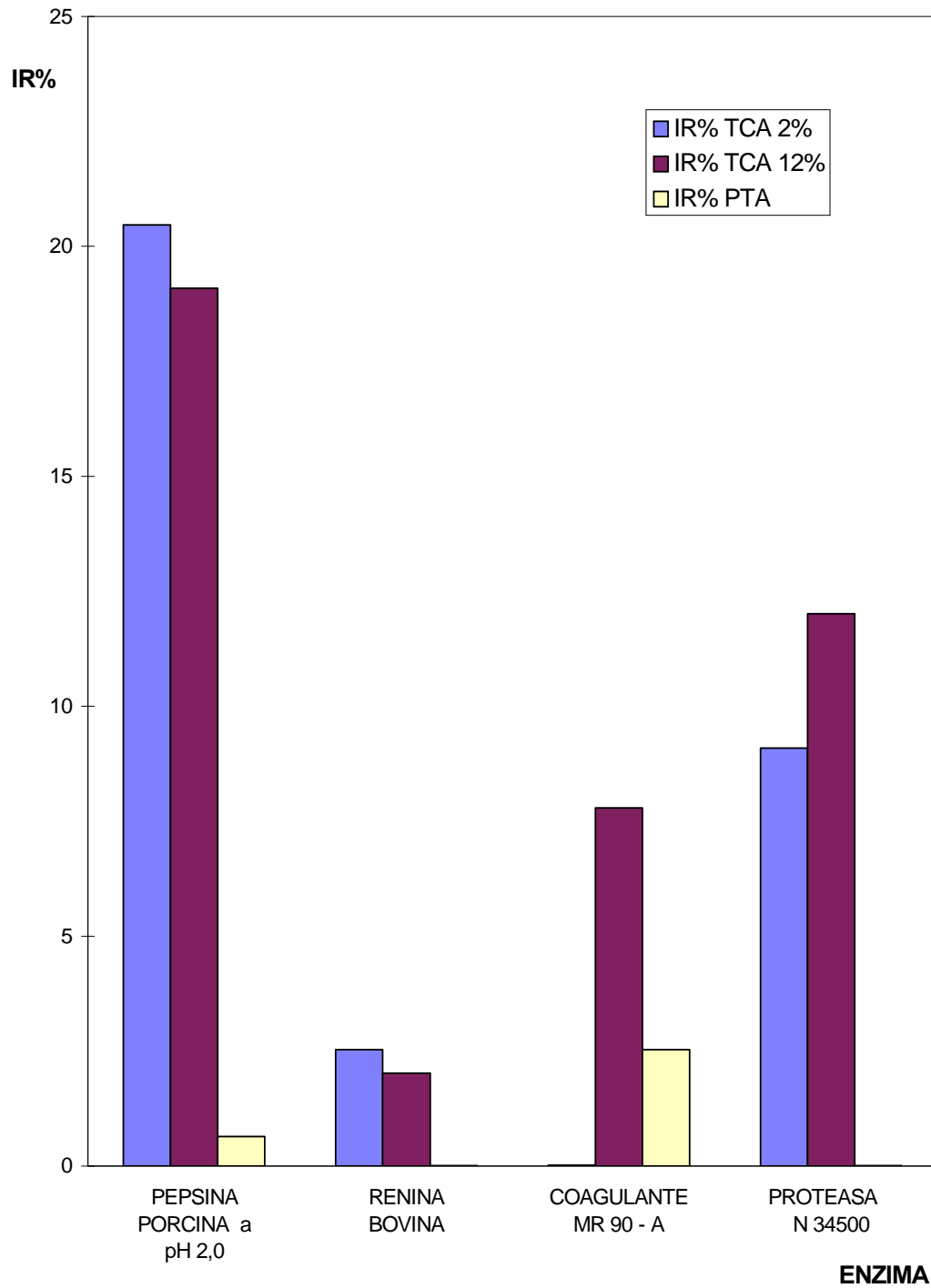
En la Tabla IX, se pueden apreciar los incrementos relativos porcentuales para el nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 2% y 12%, y en ácido fosfotúngstico para las cuatro enzimas ensayadas.

Tabla IX: Incremento relativo porcentual para el nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 2% y 12%, y en ácido fosfotúngstico correspondiente a las cuatro enzimas ensayadas sobre Dairy Lo[®].

Fracción nitrogenada Enzima	Incremento Relativo (%) en Nitrógeno soluble en ác. TCA 2%	Incremento Relativo (%) en Nitrógeno soluble en ác. TCA 12%	Incremento Relativo (%) en Nitrógeno soluble en PTA
TESTIGO	No detectable	No detectable	No detectable
PEPSINA PORCINA PURA Chr.HANSEN pH 2,0	20,47	19,59	0,64
RENINA BOVINA PURA Chr.HANSEN pH 5,4	2,53	2,02	0,01
COAGULANTE MR 90 - A SOLVAY ENZ.	0,02	7,79	2,53
PROTEASA EN POLVO N 34500 - ENSUR	9,09	12,01	0,01

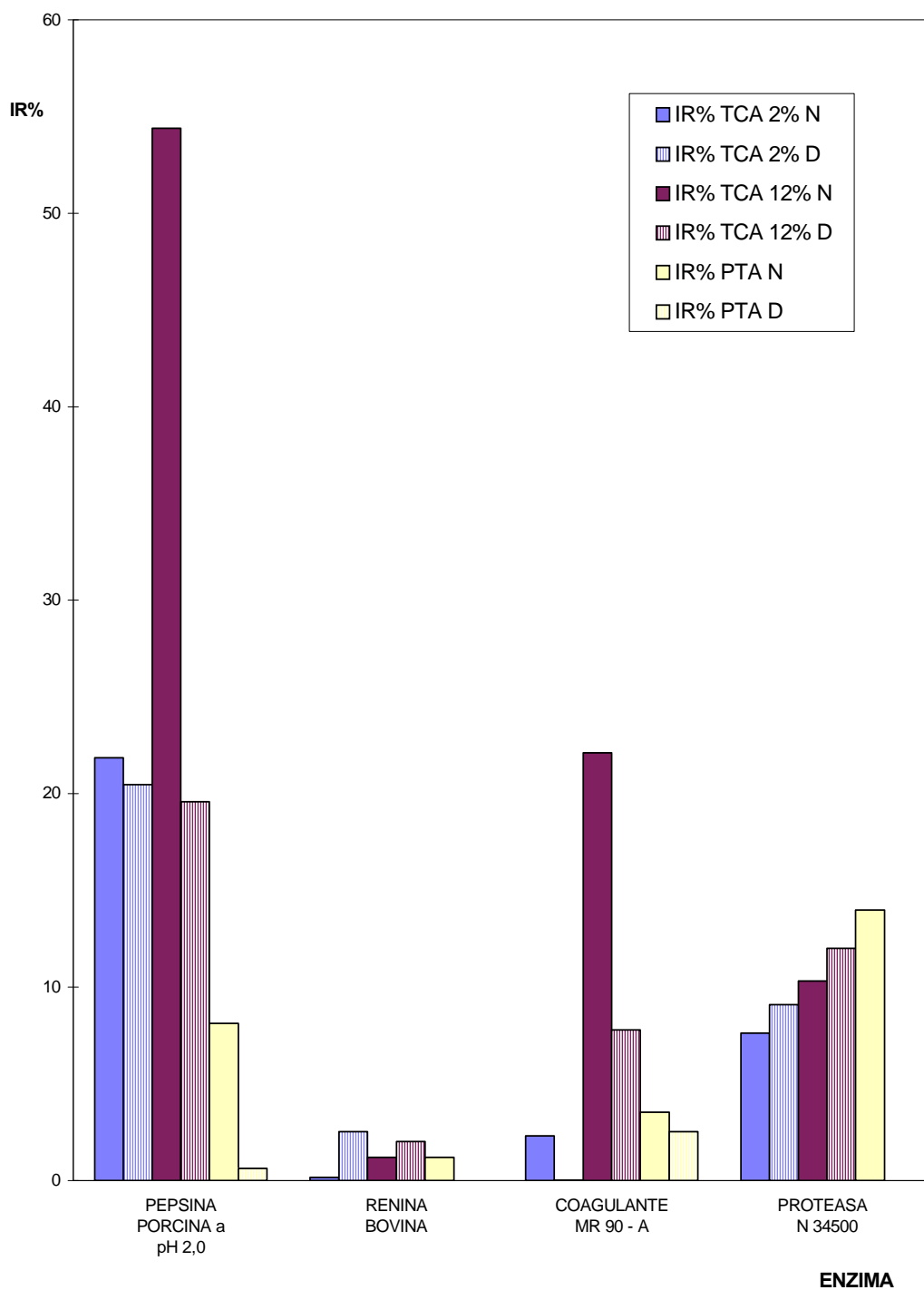
En la Figura 15 se puede apreciar el correspondiente diagrama de barras.

Figura 15a: INCREMENTO RELATIVO PORCENTUAL PARA EL NITRÓGENO SOLUBLE EN T.C.A. AL 2% Y AL 12%, Y EN P.T.A. PARA SUEROPROTEÍNAS PARCIALMENTE DESNATURALIZADAS



Haciendo una comparación entre estos resultados y los obtenidos trabajando con las sueroproteínas nativas, se verifica que las cuatro enzimas ensayadas, exhibieron marcados cambios en sus correspondientes perfiles de actividad, tal como se puede apreciar en la Figura 15b.

Figura 15 b: INCREMENTO RELATIVO PORCENTUAL PARA EL NITRÓGENO SOLUBLE EN T.C.A. 2% Y 12%, Y EN P.T.A. PARA SUEROPROTEÍNAS NATIVAS (N) Y PARCIALMENTE DESNATURALIZADAS (D)



En este estudio, la pepsina porcina (a pH 2,0) si bien aparece nuevamente como la enzima más hidrolítica, en general resultó menos activa que sobre las sueroproteínas nativas. En efecto, mediante la comparación entre los incrementos relativos para las distintas fracciones nitrogenadas obtenidos para ambas experiencias, se puede ver que si bien el nitrógeno soluble en TCA al 2% varía poco (sólo disminuye un 6%), para el nitrógeno soluble en TCA12% y en PTA, se da una reducción del 64% y 92% respectivamente.

Sin embargo, desde el punto de vista cualitativo, a través del análisis electroforético, Figura 16, se puede apreciar que en este caso, la acción de la pepsina, se manifiesta tanto sobre la **α -lactoalbúmina**, (ídem que en el caso de las sueroproteínas nativas), como sobre la **β -lactoglobulina**, aunque con una menor intensidad (calle 8). Este resultado concuerda exactamente con los obtenidos por Shi-Young Lee y col. (25), D. G. Schmidt y col. (55), (67), y M. R. Guo y col. (56), quienes, como ya se indicó, detectaron hidrólisis sobre la **β -lactoglobulina** con pepsina, sólo cuando ésta fue previamente tratada a no menos de 80°C. Evidentemente esta condición se ajusta perfectamente a este caso, puesto que la preparación del Dairy Lo[®], incluye una etapa de calentamiento a 80°C durante 10 minutos (ver materiales y métodos).

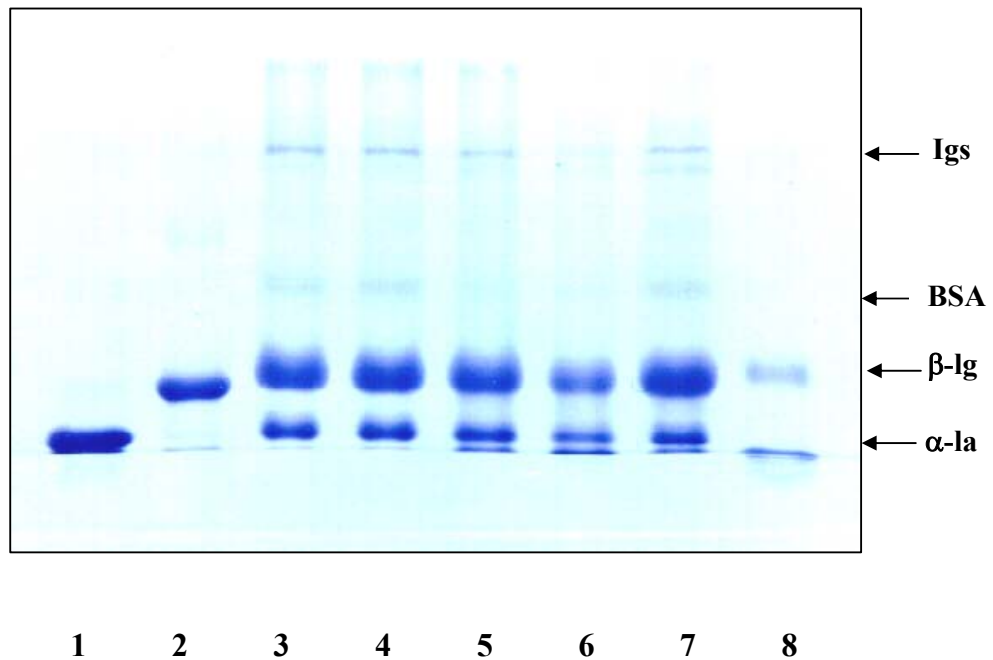


Figura 16: Electroforetograma (SDS-PAGE) correspondiente a la experiencia con sueroproteínas parcialmente desnaturalizadas.

1: α -la pura - **2:** β -Ig pura - **3:** Dairy Lo al tiempo cero - **4:** Dairy Lo a las 48 horas - **5:** Dairy Lo más proteasa N 34500, al tiempo cero - **6:** Dairy Lo más proteasa N 34500, a las 48 horas - **7:** Dairy Lo más pepsina porcina (pH 2,0), al tiempo cero - **8:** Dairy Lo más pepsina porcina (pH 2,0), a las 48 horas.

En orden de actividad decreciente, a la pepsina porcina le siguió la proteasa comercial N 34500. En esta experiencia, esta enzima produjo una hidrólisis más profunda, por cuanto arrojó incrementos en nitrógeno soluble en TCA al 2% y 12% algo mayores a los correspondientes que en el caso de las sueroproteínas nativas (19% y 16% respectivamente). Sin embargo, su actividad superficial se vio disminuida prácticamente en un 100%.

Por otro lado, electroforéticamente se pudo comprobar que al igual que en el caso anterior la acción de esta enzima recayó tanto sobre la **α -lactoalbúmina** como sobre la **β -lactoglobulina**, pudiéndose incluso apreciar un cierto ataque a la fracción **Inmunoglobulinas**, calle 6, Figura 16.

Con respecto al coagulante MR 90 - A, comparando los resultados obtenidos en esta oportunidad, con los de la experiencia anterior, se puede verificar una disminución del 99% y 65%, para los incrementos de nitrógeno soluble en TCA 2% y 12% respectivamente, y del 29% para el correspondiente a PTA. Esto indica claramente que sobre Dairy Lo[®], este coagulante exhibió una actividad hidrolítica sensiblemente menor, y con un perfil marcadamente distinto al del caso de las sueroproteínas nativas.

Cualitativamente, a través del análisis electroforético, se pudo detectar que como resultado de una acción, que al igual que en el caso del suero isoeléctrico, parece recaer sobre las dos sueroproteínas mayoritarias, aparece un producto de demolición que se manifiesta como una banda de mayor velocidad de migración

que la **α -lactoalbúmina**, tal como se puede apreciar en la calle 6 del electroforetograma de la Figura 17.

Finalmente, con relación a la renina bovina, esta enzima mostró una actividad más profunda sobre Dairy Lo[®] que sobre las sueroproteínas nativas. En efecto, si bien arrojó un menor incremento para la fracción nitrogenada soluble en PTA, las fracciones solubles en TCA 2% y 12% fueron substancialmente mayores, en especial la primera cuyo valor resultó unas quince veces superior al de la experiencia anterior. Este comportamiento también da lugar a un producto de degradación que aparece como una nueva banda con mayor velocidad electroforética que la **α -lactoalbúmina**, como se observa en la calle 8 del electroforetograma de la Figura 17.

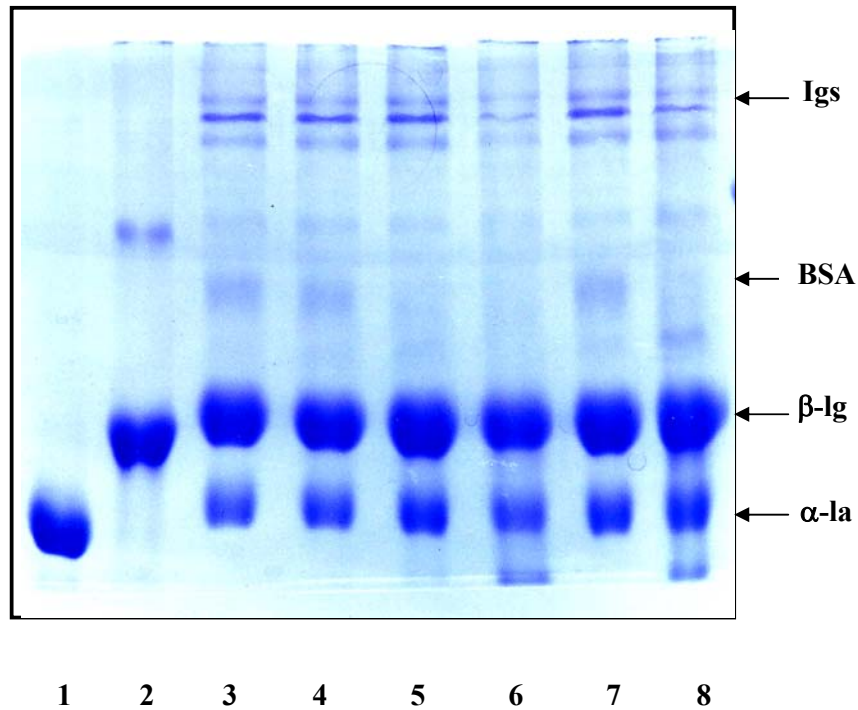


Figura 17: Electroforetograma (SDS-PAGE) correspondiente a la experiencia con sueroproteínas parcialmente desnaturalizadas.

1: α -la pura - **2:** β -Ig pura - **3:** Dairy Lo al tiempo cero - **4:** Dairy Lo a las 48 horas - **5:** Dairy Lo más coagulante M 90 A, al tiempo cero - **6:** Dairy Lo más coagulante M 90 A, a las 48 horas - **7:** Dairy Lo más renina bovina, al tiempo cero - **8:** Dairy Lo más renina bovina , a las 48 horas.

En base a esta experiencia, se puede decir que el hecho de producir una desnaturalización parcial de las sueroproteínas, modifica de diferente modo su sensibilidad hacia las cuatro enzimas ensayadas. En general se advierte un incremento en la actividad hidrolítica de la renina bovina, lo cual permite suponer que el reordenamiento de la molécula producido en el curso de la desnaturalización, hace que ésta exhiba sitios específicos de ataque, que posiblemente se encuentran ocultos en la estructura nativa. Algo similar ocurre con la proteasa comercial N 43500, dado que ésta puede ejercer una actividad más profunda (aunque menos superficial).

Por el contrario, tanto el coagulante MR 90 - A como la pepsina porcina, para este grado de desnaturalización, en general disminuyen su actividad proteolítica. Este comportamiento probablemente se deba a que los cambios conformacionales producidos en el sustrato resulten incompatibles con la especificidad de estas enzimas. En el caso de la pepsina porcina, este hecho debería ser más acentuado para la **α -lactoalbúmina**, dado que la **β -lactoglobulina** presente en Dairy Lo[®], a diferencia de las sueroproteínas nativas, se manifiesta sensible a dicha enzima.

Ensayos sobre sueroproteínas puras

Como ya se indicó, el estudio de la hidrólisis de las sueroproteínas mayoritarias; **α -lactoalbúmina** y **β -lactoglobulina** puras, se realizó desde el punto de vista cualitativo, mediante el análisis por SDS-PAGE.

a- Hidrólisis producida sobre α -lactoalbúmina pura

En el electroforetograma de la Figura 18 se puede apreciar el resultado de la acción hidrolítica de las distintas enzimas ensayadas sobre la **α -lactoalbúmina** pura.

Según este estudio, se puede ver claramente que tanto la pepsina porcina como la bovina, actuando a pH 2,0, calles 2 y 3 respectivamente, proteolizaron completamente la **α -lactoalbúmina** pura. Ambas enzimas llevaron la hidrólisis hasta la producción compuestos de muy bajo peso molecular, que o bien no fueron retenidos en el gel, o bien que se perdieron durante el proceso de coloración y decoloración, por fijación insuficiente, tal como afirma D. G Schmidt (77).

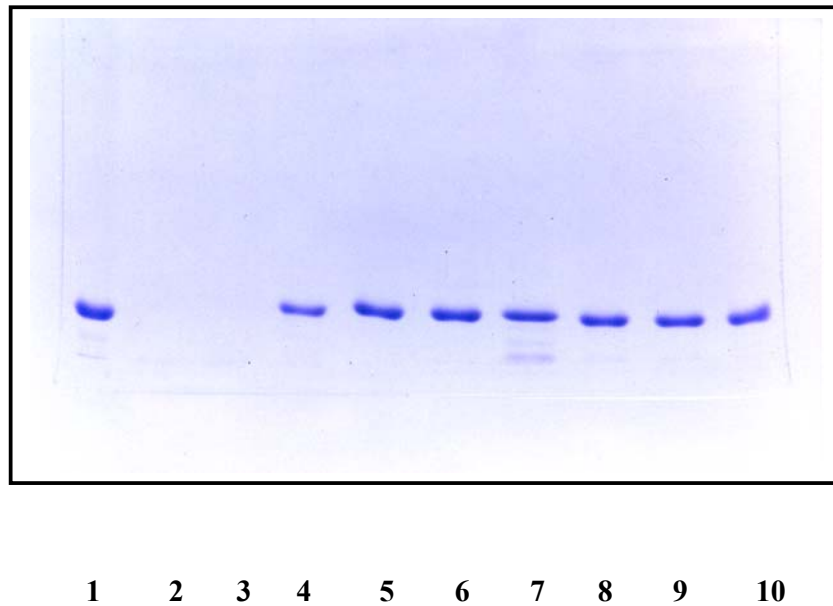


Figura 18: Electroforetograma (SDS-PAGE) correspondiente a la hidrólisis de la **α -lactoalbúmina** pura.

1: **α -lactoalbúmina** pura, al tiempo cero - **2:** **α -lactoalbúmina** pura más pepsina porcina (pH 2), a las 48 horas - **3:** **α -lactoalbúmina** pura más pepsina bovina (pH 2), a las 48 horas - **4:** **α -lactoalbúmina** pura más proteasa 34500, a las 48 horas - **5:** **α -lactoalbúmina** pura más renina bovina , a las 48 horas - **6:** **α -lactoalbúmina** pura más cuajo bovino Chr. Hansen, a las 48 horas - **7:** **α -lactoalbúmina** pura más proteasa N 8000, a las 48 horas - **8:** **α -lactoalbúmina** pura más coagulante MR 90-A, a las 48 horas – **9:** **α -lactoalbúmina** pura más proteasa 31000, a las 48 horas – **10:** **α -lactoalbúmina** pura más coagulante Meito, a las 48 horas.

En orden decreciente de actividad, las pepsinas fueron seguidas por la proteasa líquida de *Bacillus subtilis* N 8000, calle 7, la cual a diferencia de las anteriores, produjo una hidrólisis menos profunda, que sin hacer desaparecer completamente la banda de la **α -lactoalbúmina**, da lugar a la obtención de productos de demolición que se manifiestan por la aparición de nuevas bandas.

Con respecto a la otra proteasa de *Bacillus subtilis*, N 34500, calle 4, se puede apreciar la actividad desarrollada por esta enzima también produce una reducción de la banda de la **α -lactoalbúmina**, pero posiblemente debido a una actividad más superficial, por cuanto no se llegan a detectar nuevas bandas. Estos comportamientos concuerdan perfectamente con los observados al trabajar sobre el suero isoeléctrico como sustrato, por lo que se ven confirmadas las apreciaciones hechas en base a esas experiencias.

El resto de las enzimas ensayadas, desarrolló una actividad que no resulta evidenciable a través de esta metodología.

b- Hidrólisis producida sobre β -lactoglobulina pura

Sobre la **β -lactoglobulina** pura, fueron ensayadas las mismas enzimas, procediendo de igual modo que para la **α -lactoalbúmina**. El electroforetograma correspondiente, Figura 19, revela que frente a esta proteína en estado puro, bajo las condiciones de esta experiencia, existe una diferencia de comportamiento entre las dos pepsinas estudiadas. En efecto, en la calle 2, se puede ver claramente que la pepsina porcina conduce a una total hidrólisis de la **β -lactoglobulina**, dando como resultado productos de degradación cuyo bajo peso molecular impide su detección mediante esta técnica. Por el contrario, la pepsina bovina, calle 3, si bien produce una cierta hidrólisis, ésta no es tan profunda como la primera, por cuanto no llega a hacer desaparecer completamente la banda correspondiente.

En orden de actividad proteolítica decreciente, la pepsina bovina fue seguida por la proteasa 31000, dado que esta enzima lleva la hidrólisis hasta la casi total desaparición de la banda de **β -lactoglobulina**, tal como se puede observar en la calle 9. Esto confirma, de un modo más evidente, la preferencia de esta enzima por la **β -lactoglobulina**, a la que se hizo mención al trabajar con las sueroproteínas nativas contenidas en el suero isoelectrico.

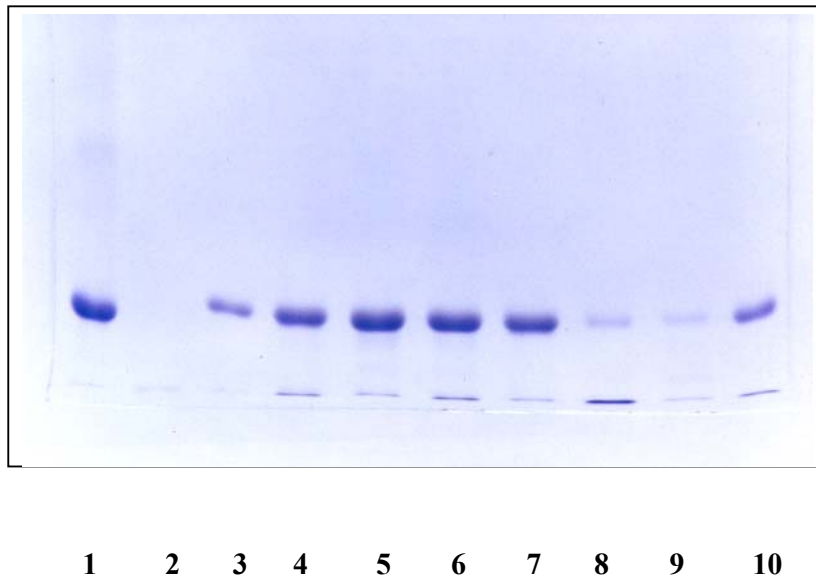


Figura 19: ElectroforetoGRAMA (SDS-PAGE) correspondiente a la hidrólisis de la **β -lactoglobulina** pura.

1: **β -lactoglobulina** pura, al tiempo cero - **2:** **β -lactoglobulina** pura más pepsina porcina (pH 2), a las 48 horas - **3:** **β -lactoglobulina** pura más pepsina bovina (pH 2), a las 48 horas - **4:** **β -lactoglobulina** pura más proteasa 34500, a las 48 horas - **5:** **β -lactoglobulina** pura más renina bovina , a las 48 horas - **6:** **β -lactoglobulina** pura más cuajo bovino Chr. Hansen, a las 48 horas - **7:** **β -lactoglobulina** pura más coagulante MR 90-A, a las 48 horas, a las 48 horas - **8:** **β -lactoglobulina** pura más proteasa N 80000, a las 48 horas – **9:** **β -lactoglobulina** pura más proteasa 31000, a las 48 horas – **10:** **β -lactoglobulina** pura más coagulante Meito, a las 48 horas.

A continuación, la proteasa de *Bacillus subtilis* N 8000, calle 8, también produjo una profunda hidrólisis, que se manifiesta por una sustancial reducción en la banda correspondiente. Este comportamiento coincide exactamente con el observado en sueroproteínas nativas. Sin embargo, la otra proteasa de *Bacillus subtilis*, N 34500, exhibió una actividad hidrolítica sensiblemente menor, que da lugar sólo a un ligero aclaramiento en la banda de la calle 4.

Seguidamente, el coagulante Meito de *Mucor pusillus*, desarrolló una proteólisis más o menos profunda, que dio lugar a una clara disminución en la intensidad de la correspondiente banda, tal como se ve en la calle 10. También este resultado confirma el obtenido en la primera experiencia, donde resultó ser el coagulante de mayor actividad.

Por otro lado, el coagulante MR 90 A, calle 7, también produjo una hidrólisis sobre la **β -lactoglobulina**, que corroboró el resultado logrado en suero isoeléctrico, aunque en este caso no se pudo detectar la aparición de alguna pequeña banda que refleje la presencia de un nuevo compuesto de degradación como en aquella oportunidad.

Finalmente la eventual hidrólisis enzimática correspondiente a la renina bovina y al cuajo bovino Chr. Hansen, calles 5 y 6 respectivamente, no pudo ser detectada mediante SDS-PAGE, por lo que se puede inferir de que se trató de una actividad sumamente escasa.

Resulta importante destacar que en todos estos casos, los productos de demolición generados, tuvieron un peso molecular que impidió su retención en el gel, o bien fueron eluidos durante el proceso de coloración y decoloración.

III.2- RESULTADOS CORRESPONDIENTES A ELABORACIONES DE QUESOS A ESCALA PILOTO

Tal como se indicó, luego de realizar las experiencias in vitro, se investigó si los resultados logrados en las mismas guardan relación con los que se pueden obtener bajo las condiciones que se dan en una de sus aplicaciones más comunes, tal como su incorporación en quesos con el objeto de aumentar su rendimiento.

En primer lugar, conviene señalar los efectos, tanto a nivel tecnológico como fisicoquímicos, que derivan de presencia de ricotta en el queso.

Implicancias de la presencia de ricotta en el queso

a- Implicancia tecnológica: Influencia en el tiempo de coagulación

La presencia de ricotta en la leche dio lugar a una disminución en el tiempo de coagulación de la leche, dado que la correspondiente a los quesos experimentales coaguló en 5 minutos, mientras que la del testigo (sin ricotta) lo hizo en 7,5 minutos.

Asimismo, los quesos experimentales exhibieron una mayor velocidad de endurecimiento de la cuajada, lo cual condujo a un adelanto en el punto de lirado. La razón de este comportamiento, se puede atribuir al descenso inicial del pH de la leche que causa el agregado de ricotta, lo cual desde el punto de vista tecnológico se traduce en una disminución del tiempo de coagulación y un

considerable aumento en la velocidad de endurecimiento de la cuajada. Efectivamente, en esta experiencia las leches de los quesos experimentales acusaron un pH de 6,45, frente a 6,6 para el testigo.

A través del seguimiento del proceso de acidificación de las cuajadas, se pudo comprobar que la diferencia inicial entre los pH de las leches con ricotta y la leche testigo, se mantuvo hasta el final del mismo. Esto hizo que las cuajadas experimentales alcancen 45 minutos antes el valor de pH 5,15 requerido para el ingreso a la salmuera.

b- Incidencia en las características fisicoquímicos del producto

En la Tabla X se presentan la humedad, el grado de maduración y el rendimiento de los quesos testigo y experimental.

Tabla X: Contenido de nitrógeno y humedad, grado de maduración y rendimiento de los quesos experimentales y testigo maduros.

Determinación	Testigo	Experimental 1	Experimental 2
Contenido de nitrógeno total (mg %)	285,4	288,3	281,0
Grado de maduración	12,51	12,92	25,40
Humedad	51,97	52,09	52,70
Rendimiento	13,95	18,04	18,09

Donde Experimental 1 corresponde al queso elaborado con adición de ricotta, Experimental 2, al queso elaborado con adición de ricotta y la proteasa N 34500, y Testigo al queso convencional, sin ningún agregado.

En base a los datos de la Tabla se puede ver que a pesar de la presencia de ricotta en los quesos experimentales, el contenido de humedad fue similar para todos los casos. Dado que ésta es una condición indispensable para poder establecer una comparación, para lograr este resultado, durante las elaboraciones se puso un especial cuidado en la tecnología, procurando realizar el lirado de la

cuajada con la consistencia justa, y efectuando un menor trabajo en tina para evitar un excesivo desuerado.

Por otro lado, se puede apreciar que el agregado de ricotta a los quesos experimentales produjo un notable incremento en el rendimiento. En promedio se logró recuperar 0,9 Kg. de queso por cada Kg. de ricotta agregado.

Finalmente, con relación al grado de maduración, se puede ver que el correspondiente al queso experimental 2 resultó muy superior al de los otros dos (más del doble con respecto al testigo). Esto indudablemente se debe a la acción desarrollada por la proteasa N34500 tanto sobre las caseínas como sobre las sueroproteínas.

Por otra parte, habida cuenta de la escasa diferencia entre el grado de maduración del queso testigo y del experimental 1, se puede inferir que la incorporación de ricotta, al menos en esa proporción, no interfiere en los complejos fenómenos físicos y químicos propios de la maduración.

Actividad hidrolítica en los quesos

En la Figura 20 se puede apreciar el análisis electroforético correspondiente a esta experiencia

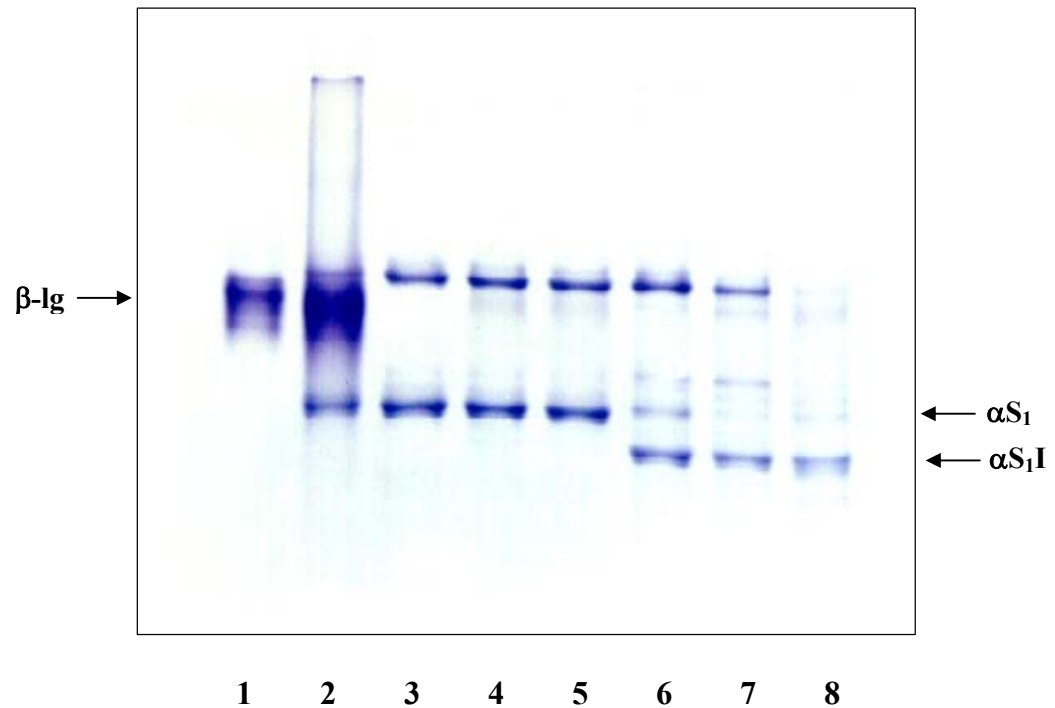


Figura 20: Electroforetograma (UREA-PAGE) correspondiente a la experiencia casearia.

1: β -Ig pura – 2: ricotta pura – 3: Cuajada queso testigo – 4: Cuajada queso con ricotta – 5: Cuajada queso con ricotta más enzima – 6: Queso testigo maduro – 7: Queso con ricotta, maduro – 8: Queso con ricotta más enzima, maduro.

En este electroforetograma, se puede ver que en los quesos con ricotta la **β -lactoglobulina** (sueroproteína mayoritaria), aparece como una tenue banda entre las **caseínas α 1 y β** . En el queso experimental 2 (con ricotta más enzima) maduro, calle 8, se nota que dicha banda una sufre un sensible aclaramiento. Dado que este efecto no se observa en el queso experimental 1 (con ricotta pero sin enzima), calle 7, se deduce que esta proteína es resistente a la acción proteolítica del coagulante, y que su hidrólisis se debe indudablemente a la actividad enzimática desarrollada por la proteasa N34500. Esta observación se correlaciona con los resultados logrados en las experiencias con Dairy Lo[®], donde la **β -lactoglobulina** con un importante grado de desnaturalización se mostró sensible a esta enzima (el Dairy Lo[®], tiene una tasa global de desnaturalización del 60 al 80%).

Con respecto a la proteólisis general, resulta importante destacar que la presencia de las sueroproteínas no interfiere en el proceso hidrolítico de las caseínas. En efecto, a través de este análisis se comprueba que durante la maduración, en todos los quesos se produce una profunda degradación de la **α 1 caseína** pudiéndose observar la formación de la fracción **α 1II** (Phe 24 -Trp 199), típica de la acción del coagulante (84-85), calles 6, 7 y 8. Este resultado es coincidente con los logrados por C. G. Lo y col. (86), quienes estudiaron la proteólisis que se produce en quesos Havarti elaborados por ultrafiltración con leche tratada térmicamente a 72°C durante 17 seg. (sueroproteínas mínimamente desnaturalizadas, prácticamente nativas), y leche tratada igual tiempo a 85°C

(sueroproteínas desnaturalizadas), haciendo una comparación con un queso convencional. Estos autores encontraron que las sueroproteínas desnaturalizadas, no interfirieron en la acción de la quimosina sobre la **α 1 caseína**, alcanzando para esta proteína, el mismo nivel de hidrólisis que en el queso convencional usado como testigo. Por el contrario, en los quesos elaborados por ultrafiltración, pero con las sueroproteínas nativas, la hidrólisis de esta caseína resultó significativamente menor. Estos resultados que parecen contraponerse con los que estos mismos autores encontraron in vitro (38) (ver en Introducción: Incidencia de las sueroproteínas en la maduración del queso), sirven para poner de relieve la diferencia que puede existir entre este tipo de ensayo y uno caseario. Si bien en sus estudios previos C. G. Lo y col. encontraron que térmicamente desnaturalizada, la **β -lactoglobulina** ejercía un mayor efecto inhibitor de la acción de la quimosina sobre la **α 1 caseína**, en aquella oportunidad trabajaron con un sistema de leche ultrafiltrada simulada, en el que primero se desnaturalizó térmicamente las sueroproteínas (en agua destilada), y luego se las agregó a las soluciones de **α 1 caseína** antes adicionar de la quimosina. Bajo estas condiciones, la **β -lactoglobulina**, desnaturalizada o no, estaba libre para difundir e interactuar con la quimosina. En el caso de los quesos elaborados por ultrafiltración, dado que la desnaturalización de las sueroproteínas se realiza en la misma leche, es probable que una elevada proporción de éstas se encuentre asociada a las a las caseínas, lo que estaría restringiendo su difusión.

Con relación a la fracción **α SI**, en las calles 6 y 7 se puede ver que la misma que resulta resistente a los sistemas proteolíticos presentes en los quesos testigo y experimental 1 respectivamente. Por el contrario, en el queso experimental 2, calle 8, debido ciertamente a la actividad de la proteasa N 34500, se advierte que dicha fracción sufre una ulterior degradación que hace que su banda aparezca más clara, pudiéndose incluso apreciar una nueva banda muy sutil, de mayor velocidad electroforética.

Por último, con respecto a la **β caseína**, en las calles 6 y 7, se puede ver que ésta resulta insensible a la actividad proteolítica del cuajo, lo cual es coincidente con los resultados obtenidos en nuestros estudios sobre la maduración del queso cremoso argentino (87). Por el contrario, en el queso experimental 2, calle 8, se observa que esta caseína, fue drásticamente hidrolizada por la proteasa N 34500.

Este es un aspecto que puede resultar interesante en quesos donde la hidrólisis de la **β caseína**, debida fundamentalmente a la plasmina, juega un rol de importancia en el proceso de maduración. Cuando este tipo de queso se elabora con inclusión de sueroproteínas, puede ocurrir que la actividad de esta enzima se vea comprometida debido a la inhibición que produce la **β -lactoglobulina** (14). Tal es el caso de la experiencia realizada por K. B. Qvist y col. (88), quienes trabajando con queso Havarti (pasta cruda) elaborado por ultrafiltración, a los 120 días de almacenamiento, detectaron que éste exhibió menor desarrollo de sabor que uno tradicional usado como testigo. Dado que esta

diferencia fue asociada a un retardo en la hidrólisis de la **β caseína** ocasionado por la acción inhibitoria de la **β -lactoglobulina**, sería interesante investigar si en un caso así, la adición de una proteasa como la empleada en nuestra experiencia permite salvar este inconveniente.

Cabe aclarar que en quesos duros de pasta cocida donde a la plasmina le cabe un papel fundamental en la maduración, (proteolizando principalmente la **β caseína**) (89), este problema de inhibición no se presenta, pues este tipo de queso no se elabora por vías no convencionales que involucren la inclusión de las sueroproteínas ya que esto iría en detrimento de su tipicidad.

Resultado de la evaluación sensorial

Los resultados de las evaluaciones sensoriales se pueden apreciar en la Tabla XI, donde se presentan los valores medios de los atributos y la homogeneidad del grupo para las muestras ensayadas.

Tabla XI: Resultado de la evaluación sensorial

Muestra	Aroma	Color	Textura	Sabor
Testigo	4,63 a	4,86 a	7,80 ab	3,84 ab
Experimental 1	4,79 a	4,86 a	8,34 b	4,46 b
Experimental 2	4,65 a	4,41 a	7,03 a	3,82 a

ab Los valores medios dentro de la misma columna con diferente subíndice son significativamente diferentes ($P < 0,05$), de acuerdo al resultado del test de ANOVA.

A partir de los datos de la tabla se puede ver que entre los quesos testigo y experimentales no hubo diferencias significativas de aroma y color. Por el contrario, sí las hubo para la textura y el sabor, tanto entre testigo y experimentales, como entre los experimentales entre sí.

Es de destacar que en el queso con enzima, a pesar de la intensa hidrólisis producida, no se detectó sabor amargo, el cual se origina cuando una proteólisis inadecuada conduce a la acumulación de péptidos bajo peso molecular, particularmente hidrofóbicos, provenientes principalmente de la β caseína (89-90).

Por otro lado es importante destacar que para todos los atributos evaluados, el queso experimental 1 arrojó el mayor puntaje en valores absolutos.

Esto indica que la presencia de la ricotta (al menos en esa proporción) no altera el desarrollo de las características organolépticas del queso, y por el contrario mejora la textura y exalta el aroma y el sabor.

IV- CONCLUSIONES

Las sueroproteínas son sustancias nitrogenadas constitutivas de la leche que poseen una óptima calidad nutritiva e importantes propiedades funcionales, que hacen que su inclusión en distintos tipos de alimentos sea una práctica cada vez más frecuente. En muchas aplicaciones, es fundamental conocer la respuesta de estas proteínas a la acción de los sistemas enzimáticos inherentes al medio al que se incorporan. Un claro ejemplo de ello es la elaboración de quesos enriquecidos con proteínas del suero. Sin embargo, en este caso, más allá del aporte nutritivo y el incremento en el rendimiento, es menester conocer el impacto que esta práctica puede producir en el proceso de maduración y por ende en las características del producto final. En este sentido, es importante investigar el comportamiento de estas proteínas frente a los diversos sistemas enzimáticos presentes en el queso. Para ello, se debe tener en cuenta el estado conformacional de las moléculas, dado que las técnicas más comunes para incorporar las sueroproteínas en un queso, pueden implicar una desnaturalización de las mismas como en el procedimiento Centri Whey, o no, como en las elaboraciones por ultrafiltración donde prácticamente se encuentran en estado nativo.

Para realizar este estudio, los ensayos *in vitro*, bajo condiciones similares a las que se dan en un queso, constituyen una herramienta muy útil mediante la cual se puede obtener una información previa, más o menos próxima a lo que ocurrir en un proceso caseario.

A través de los análisis sobre sueroproteínas nativas (suero isoeléctrico), a pH 5,4, se pudo comprobar que las distintas enzimas coagulantes puras ensayadas desarrollaron una muy escasa actividad proteolítica, en particular la renina bovina cuya acción fue muy semejante a la observada en el testigo. Tanto la pepsina porcina como bovina, presentaron perfiles muy similares, aunque ligeramente más elevado para la primera. El análisis electroforético revela que frente a estas enzimas, la **α -lactoalbúmina** aparece como la proteína más susceptible. En base a estos resultados es esperable que al menos en las proporciones adoptadas en estas experiencias, estas enzimas tengan muy poca influencia sobre las sueroproteínas nativas en el ambiente propio de un queso. Sin embargo, cuando la incubación se realiza al pH óptimo de las pepsinas (2,0), la situación cambia substancialmente, dado que éstas ocasionan una profunda hidrólisis, que cualitativamente se manifiesta haciendo desaparecer la banda correspondiente a la **α -lactoalbúmina** en el electroforetograma. En este caso además de la intensidad, también cambian los perfiles de actividad, dado que la pepsina porcina incrementa mucho más la fracción nitrogenada insoluble en ácido tricloroacético al 12%, que la pepsina bovina.

Con respecto a las mezclas comerciales de enzimas coagulantes, las de origen fúngico, Meito (*Mucor pusillus*) y MR 90-A (*Mucor miehei*), resultaron ser los más activos, principalmente el primero. Asimismo, los niveles de hidrólisis logrados por estos coagulantes resultaron sensiblemente más altos que los correspondientes a las enzimas coagulantes puras, a pH 5,4.

El coagulante MR 90-B, también de *Mucor miehei*, pero termosensible, alcanzó un menor nivel de hidrólisis que el MR 90-A (especialmente en la fracción nitrogenada soluble en ác. tricloroacético al 12%), exhibiendo a su vez un perfil marcadamente diferente.

Desde el punto de vista cualitativo, a través de los análisis electroforéticos, se encontró que a diferencia de las enzimas coagulantes puras, la acción de los coagulantes comerciales de origen fúngico, estuvo dirigida principalmente hacia la **β -lactoglobulina**.

El cuajo bovino líquido, confirmó su escasa actividad hidrolítica hacia las sueroproteínas, la cual sin embargo fue superior a la de la del coagulante Maxiren. Con respecto a este último, el cual consiste en renina producida por fermentación de *Kluyveromyces lactis*, se pudo comprobar que su comportamiento fue prácticamente idéntico al de la renina de origen bovino.

Finalmente, las tres enzimas proteolíticas comerciales, dieron lugar a un nivel de hidrólisis comparable al de los coagulantes de origen fúngico, pero con perfiles muy diferentes. En este sentido, es notable la diferencia que se da entre las dos enzimas de *Bacillus subtilis*, N 34500 y N 8000, cuyos perfiles de hidrólisis fueron completamente diferentes, correspondiéndole a la segunda el incremento en nitrógeno soluble en ác. tricloroacético al 12% más alto de todas las enzimas ensayadas a pH 5,4. Cualitativamente, la acción de estas proteasas estuvo dirigida tanto hacia la **α -lactoalbúmina**, como hacia la **β -lactoglobulina**.

La proteasa N 31000 de *Aspergillus oryzae* dio lugar a una actividad proteolítica superficial, que arrojó los incrementos en nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12% y en fosfotúngstico más elevados, con un ínfimo incremento en el nitrógeno soluble en ác. tricloroacético al 2%.

Esta proteasa, al igual que los coagulantes de origen fúngico, atacó principalmente a la **β -lactoglobulina**.

En relación a la hidrólisis desarrollada sobre las suero proteínas parcialmente desnaturalizadas (Dairy Lo[®]), se encuentra que los patrones de actividad de las cuatro enzimas ensayadas fueron sensiblemente distintos.

La pepsina porcina a pH 2,0, si bien sigue siendo la más activa, exhibe un perfil marcadamente diferente al del caso del suero isoeléctrico, con un notable aumento en la fracción nitrogenada soluble en ác. tricloroacético al 2%. Este comportamiento posiblemente se deba entre otras cosas, a que en estas condiciones también ataca a la **β -lactoglobulina**, la cual en su estado nativo era insensible.

Finalmente, a través del estudio in vitro de las suero proteínas puras, se pudo confirmar cualitativamente la selectividad de las distintas enzimas ensayadas. Con respecto a la **α -lactoalbúmina**, como ya se había comprobado, esta proteína fue totalmente hidrolizada por la acción de las dos pepsinas (porcina y bovina) a pH 2,0. El otro efecto que se pudo apreciar fue el correspondiente a las proteasas de *Bacillus subtilis*, N 34500 y N 8000, en especial de esta última cuya acción fue más intensa, dando lugar a la formación

de nuevas bandas. Las demás enzimas desarrollaron una actividad mucho menor, y por ende no se pudo detectar por este medio.

En cuanto a la **β -lactoglobulina**, si bien fue completamente hidrolizada por la pepsina porcina, frente a la pepsina bovina se mostró marcadamente más resistente que la **α -lactoalbúmina**, exhibiendo un nivel de hidrólisis menos profundo, el cual resultó comparable al producido por el coagulante Meito (*Mucor pusillus*).

La proteasa N 31000 de *Aspergillus oryzae*, también produjo una intensa proteólisis que llegó hasta la casi total desaparición de la de la banda.

Por su parte, el otro coagulante de origen fúngico MR 90-A, de *Mucor miehei*, también ejerció una actividad electroforéticamente detectable, aunque mucho más reducida que el anterior.

A través de estos comportamientos se puede ver que en general, estas proteasas de origen fúngico manifiestan una mayor preferencia por **β -lactoglobulina**, que por la **α -lactoalbúmina**.

En cuanto a las proteasas de *Bacillus subtilis*, N 34500 y N 8000, también fueron activas sobre la **β -lactoglobulina**, particularmente la segunda, que dio lugar a una marcada atenuación de la banda correspondiente.

Este comportamiento demuestra que estas enzimas de origen bacteriano, son activas sobre las dos sueroproteínas mayoritarias.

La actividad de los coagulantes de origen animal resultó electroforéticamente inapreciable.

Por último, con respecto a la actividad proteolítica observada en quesos, se puede concluir que la incorporación de sueroproteínas en queso cremoso, a través del agregado de ricotta a la leche de elaboración, al menos a un nivel del 4,5%, no afecta el normal desarrollo de los procesos hidrolíticos implicados en la maduración.

La actividad de la proteasa N 34500 sobre la sueroproteína mayoritaria (**β -lactoglobulina**) evidenciada in vitro, pudo verificarse también en el ambiente del queso. Por el contrario, en el queso con ricotta, pero sin dicha proteasa, la **β -lactoglobulina** permaneció inalterada, comportándose así como una carga inerte, lo cual confirmó su resistencia a la acción del cuajo líquido de bovino adulto.

En base a esta experiencia, dado que el agregado la enzima N 34500 no condujo a una mejora en las características organolépticas, y considerando además el costo de la misma, su agregado no parece oportuno.

No obstante, sería interesante estudiar la posibilidad de que el agregado de una proteasa exógena como en esta experiencia, permita la incorporación de una mayor cantidad de ricotta. De este modo, teniendo en cuenta que el valor comercial de esta última es sensiblemente inferior al del queso, un aumento en el rendimiento por esta vía, tiene una incidencia económica directa.

Asimismo, dado que esta enzima dio lugar a un aumento en el grado de maduración, su adición también podría resultar un importante medio para acelerar este proceso, sobre todo en este tipo de queso cuya fuerte demanda a veces no permite contar con los plazos necesarios para su concreción.

ANEXO I

ACTIVIDAD COAGULANTE

Determinación del título de las enzimas coagulantes a través del Método de Berridge modificado por Huck y Zalazar (61)

El título T de un coagulante se define como la cantidad de leche (en mililitros) a 35°C, que se puede coagular con 1 ml de enzima coagulante, durante 40 minutos.

Técnica operatoria

a- Preparación del sustrato

Para este ensayo, se emplean 10 ml de leche, la cual se prepara reconstituyendo leche en polvo al 12% mediante una solución de 1,11 gr de cloruro de calcio por litro de agua destilada, a los efectos de tener una concentración equilibrada de calcio.

b- Preparación de la solución de enzima

Para hacer esta experiencia se emplean 2ml de una solución de la enzima cuyo título se quiere determinar. Esta solución se prepara en el buffer acetato de pH 5,5, indicado en materiales y métodos, empleando una concentración de

enzima tal que permita obtener un tiempo de coagulación apropiado. Para una correcta determinación, la técnica aconseja trabajar con tiempos de coagulación que se encuentren entre los 15 y 30 segundos (óptimo 20 seg.).

c- Procedimiento

Se colocan los 10 ml de leche en un tubo de ensayo en baño termostático a 35°C. Una vez alcanzada esta temperatura se adicionan 2 ml de la solución de enzima, agitando con una pequeña espátula diseñada para tal fin. El tiempo de coagulación se determina mediante un cronómetro, observando el momento en que aparecen grumos en la película descendente que se forma contra la pared del tubo mediante la espátula.

d- Expresión del resultado

En base a la definición para el cálculo de T se emplea la siguiente expresión:

$$T = \frac{2400 \times M}{R \times t}$$

Donde

T : es el título del coagulante

M : es la cantidad de leche empleada en la experiencia

R : es la cantidad de enzima presente en 2 ml de solución empleada

t : es el tiempo de coagulación en segundos

ANEXO II

RELACIÓN ENZIMA/SUSTRATO

Determinación de la cantidad de cuajo líquido de bovino adulto (Chr. Hansen) para lograr el mayor nivel de hidrólisis al cabo de 48 horas de incubación

Como ya se indicó para poder establecer comparaciones entre las distintas enzimas ensayadas, se adoptó como referencia el cuajo líquido de bovino adulto (ver Materiales y Métodos: Relación enzima/sustrato). Dicho coagulante fue elegido por ser el de mayor difusión en nuestro país, y por tener un título lo suficientemente bajo, al que pueden equipararse por dilución las demás enzimas.

Para determinar la mínima concentración con la cual se puede alcanzar el mayor grado de hidrólisis posible, luego de 48 horas de incubación, se realizaron cuatro experiencias empleando la concentración normal usada en tina, el doble, el triple y el cuádruple de la misma.

Considerando que para quesos duros y semiduros se usa un promedio de 40 ml para 100 litros de leche, equivalentes a 0,08 ml para 200 ml (volumen de suero empleado en la experiencia) las cantidades adoptadas fueron: 0,08 ml, 0,16 ml, 0,24 ml y 0,32 ml para ese volumen de sustrato.

En la Tabla XII se pueden apreciar los incrementos relativos porcentuales para las distintas fracciones nitrogenadas analizadas.

Tabla XII: Incrementos relativos porcentuales para el nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 2% y 12% y en ácido fosfotúngstico, para las distintas concentraciones de cuajo bovino líquido, sobre suero isoeléctrico.

Fracción nitrogenada Concentración	Incremento Relativo (%) en Nitrógeno soluble en ác. TCA 2%	Incremento Relativo (%) en Nitrógeno soluble en ác. TCA 12%	Incremento Relativo (%) en Nitrógeno soluble en PTA
0,08 ml cuajo/200 ml	0,45	6,79	1,72
0,16 ml cuajo/200 ml	0,47	6,82	1,75
0,24 ml cuajo/200 ml	0,48	6,84	1,76
0,32 ml cuajo/200 ml	0,48	6,85	1,75

En base a los datos de la tabla, se puede ver a partir de la tercera concentración (0,24 ml de cuajo/200 ml de suero), la actividad proteolítica del cuajo tiende a estabilizarse, no evidenciándose cambios significativos para la siguiente dilución. Bajo esta observación, para las experiencias desarrolladas en el presente trabajo se adoptó como referencia el cuajo de bovino adulto, en una relación enzima/sustrato tres veces superior a la habitualmente empleada en los procesos casearios.

V- BIBLIOGRAFÍA

1. Centro de la Industria Lechera (1997). “Situación Mundial de la Lechería”.
Industria Lechera **78** (711): 131-159.

2. Alais, Ch. (1985). “Prótidos de la leche. Caseína y fenómeno de la coagulación”. En Ciencia de la Leche. Principios de técnica lechera. Ed. Reverté, S.A. Barcelona, España.

3. Rollema, H. S. (1992) “Casein Association and Micelle Formation” En Advanced Dairy Chemistry, Volume 1, Proteins. Edited by P. F. Fox. Published by Chapman & Hall, London, England.

4. Veisseyre, R. (1980) “Caracteres, composición y estructura de la leche”. En Lactología Técnica. Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche. Ed. Acribia, Zaragoza, España.

5. de Witt, J. N. (1981) “Structure and functional behaviour of whey proteins”.
Netherlands Milk and Dairy Journal. **35**: 47-64.

6. Brew, K. and Grobler, J. A. (1992) “ α -lactoalbumin”. En *Advanced Dairy Chemistry, Volume 1, Proteins*. Edited by P. F. Fox. Published by Chapman & Hall, London, England.

7. Hambling, S. G.; Mc Alpine, A. S. and Sawyer, L. (1992) “ β -lactoglobulin” en *Advanced Dairy Chemistry, Volume 1, Proteins*. Edited by P. F. Fox. Published by Chapman & Hall, London, England.

8. Walstra, P. and Jenne, R. (1987) “Proteínas”. En *Química y Física Lactológica*. Ed. Acribia, Zaragoza, España.

9. Vegarud, G. E.; Molland, T. S.; Bravold, M. J.; Devold, T. G.; Alestrøm, P.; Steine, T.; Rogne, S. and Langsrud, T. (1989) “Rapid separation of genetic variants of caseins and whey proteins using urea-modified gels and fast electrophoresis”. *Milchwissenschaft* **44** (11): 689-691.

10. Godovac-Zimmermann, J. and Braunitzer, G. (1987) “Modern aspects of primary structure and function of β -lactoglobulins”. *Milchwissenschaft* **42** (5): 294-297.

11. Puyol, P.; Perez, M. D.; Mata, L.; Ena, J. M. and Calvo, M. (1993) “Effect of Retinol and Fatty Acid Binding by Bovine β -lactoglobulin on its Resistance to Trypsin Digestion”. *International Dairy Journal* **3**: 589-597.

12. Briand, L.; Chobert, J. M. and Haertle, T. (1994) “Tryptic hydrolysis of esterified β -casein and β -lactoglobulin”. *Milchwissenschaft* **49** (7): 367-371.

13. Grufferty, M. B. and Fox, P. (1988) “Milk alkaline proteinase”. Review Article. *Journal of Dairy Research* **55**: 609-630.

14. Bastian, E. D.; Hansen, K. G. and Brown, R. J. (1993) “Inhibition of Plasmin by β -Lactoglobulin Using Casein and Synthetic Substrate”. *Journal of Dairy Science* **76**: 3354-3361.

15. Veisseyre, R. (1980) “Comportamiento de la leche ante el frío y el calor”. En *Lactología Técnica. Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche*. Ed. Acribia, Zaragoza, España.

16. Ghosh, B. C.; Steffl, A. and Kessler, H. G. (1996) “Rennetability of milk containing different heat-denatured whey protein”. *Milchwissenschaft* **51** (1): 28-31.

- 17.** Larson, B. L. (1992) “Inmunoglobulins of the Mammary Secretions”. En *Advanced Dairy Chemistry, Volume 1, Proteins*. Edited by P. F. Fox. Published by Chapman & Hall, London, England.
- 18.** Mata, L.; Castillo, H.; Sánchez, L.; Puyol, P. and Calvo, M. (1994) “Effect of trypsin on bovine lactoferrin and interaction between the fragments under different conditions”. *Journal of Dairy Research* **61**: 427-432.
- 19.** Shimazaki, K.; Tanaka, T.; Kon, H.; Oota, K.; Kawaguchi, A.; Maki, Y. and Sato, T. (1993) “Separation and Characterization of the C-Terminal Half Molecule of Bovine Lactoferrin”. *Journal of Dairy Science* **76**: 946-955.
- 20.** Peltonen-Shalaby, R. and Mangino, M. E. (1986) “Compositional Factors That Affect the Emulsifying and Foaming Properties of Whey Protein Concentrates”. *Journal of Food Science* **51** (1): 91-95.
- 21.** Kim, Y. A.; Chism, G. W. and Mangino, M. E. (1987) “Determination of the beta-Lactoglobulin, alpha-Lactoalbumin and Bovine Serum Albumin of Whey Protein Concentrates and Their Relationship To Protein Functionality”. *Journal of Food Science* **52** (1): 124-127.

- 22.** Morr, C. V. and Foegeding, E. A. (1990) “Composition and Functionality of Commercial Whey and Milk Protein Concentrates and Isolates: A Status Report”. *Food Technology* **4**: 100-112.
- 23.** Beuchel, B. C.; Culberston, J. D.; Partridge, J. A. and Smith, D. M. (1992) “Gelation and Emulsification Properties of Partially Insolubilized Whey Protein Concentrates”. *Journal of Food Science* **57** (3): 605-609.
- 24.** Turgeon, S. L.; Gauthier, S. F. and Paquin, P. (1992) “Emulsifying Property of Whey Peptide Fractions as a Function of pH and Ionic Strength”. *Journal of Food Science* **57** (3): 601-604.
- 25.** Lee, Shih-Young; Morr, Ch. V. and Ha, E. Y. W. (1992) “Structural and Functional Properties of Caseinate and Whey Protein Isolate as Affected by Temperature and pH”. *Journal of Food Science* **57** (5): 1210-1229.
- 26.** de Rham, O. and Chanton, S. (1984) “Role of Ionic Environment in Insolubilization of Whey Protein During Heat Treatment of Whey Products”. *Journal of Dairy Science* **67**: 939-949.

- 27.** Veisseyre, R. (1980) “Tecnología de los productos derivados del lactosuero y la mazada”. En *Lactología Técnica. Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche*. Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- 28.** Alais, Ch. (1985). “Productos lácteos diversos”. En *Ciencia de la Leche. Principios de técnica lechera*. Ed. Reverté, S.A. Barcelona, España.
- 29.** Kilara, A. (1994) “Whey Protein Functionality” En *Protein Functionality in Food Systems*. Edited by N. S. Hettiarachchy and G. R. Ziegler. Published by Marcel Dekker, New York.
- 30.** Miller, M. S. (1994) “Proteins as Fat substitutes” En *Protein Functionality in Food Systems*. Edited by N. S. Hettiarachchy and G. R. Ziegler. Published by Marcel Dekker, New York.
- 31.** Young, S. L. Sarda, X. and Rosemberg, M. (1993) “Microencapsulating Properties of Whey Proteins. 1. Microencapsulation of Anhydrous Milk Fat”. *Journal of Dairy Science* **76**: 2868-2877.
- 32.** Young, S. L. Sarda, X. and Rosemberg, M. (1993) “Microencapsulating Properties of Whey Proteins. 2. Combination of Whey Proteins with Carbohydrates”. *Journal of Dairy Science* **76**: 2878-2885.

- 33.** Mahmoud, R. and Savello, P. A. (1993) “Solubility and Hydrolyzability of Films Produced by Transglutaminase Catalytic Crosslinking of Whey Protein”. *Journal of Dairy Science* **76**: 29-35.
- 34.** Maubois, J. L. (1990) “La leche de quesería: Modificaciones en el contenido de proteínas de la leche”. En *El Queso*. Coord. A. Eck. Ed. Omega, Barcelona, España.
- 35.** Alais, Ch. (1985). “Quesos. Enzimas coagulantes. Métodos modernos”. En *Ciencia de la Leche. Principios de técnica lechera*. Ed. Reverté, S.A. Barcelona, España.
- 36.** Drake, M. A.; Boylston, T. D. and Swanson, B. G.(1996) “Fat Mimetics in Low-Fat Cheddar Cheese”. *Journal of Food Science* **61** (6): 1267-1270.
- 37.** Mc Mahon, D. J.; Alleyne, M. C.; Fife, R. L. and Oberg, C. J. (1996) “Use of Fat Replacers in Low Fat Mozzarella Cheese”. *Journal of Dairy Science* **79**: 1911-1921.
- 38.** Lo, C. G. and Bastian, E. D. (1997) “Chymosin Activity Against α s1-Casein in Model Systems: Influence of Whey Proteins”. *Journal of Dairy Science* **80**: 615-619.

- 39.** Krause, Von W.; Ludwig, E. und Bernstein, A. (1995) "Kinetische Untersuchungen zum proteolytischen Abbau von Casein, isolierten Molkenproteinen und Casein- Molkenprotein-Copräzipitat durch Aspartat-Proteasen mit Milchgerinnungs-wirkung". *Milchwissenschaft* **50** (1): 6-10.
- 40.** Santoro, M.; Faccia, M. (1995) "Formaggio arricchito in sieroproteine. Nota III: la proteolisi". *La Rivista di Scienza Dell' Alimentazione* **24** (4): 549-554.
- 41.** Mistry, V. V. and Maubois, J. L. (1993) "Aplication of Membrane Separation Technology to Cheese Production" En *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Volume 1. General Aspects. Edited by P. F. Fox Published by Chapman & Hall, London, England.
- 42.** Ju, Z. Y.; Otte, J.; Madsen, J. S. and Qvist, K. B. (1995) "Effects of Limited Proteolysis on Gelation and Gel Properties of Whey Protein Isolate". *Journal of Dairy Science* **78**: 2119-2128.
- 43.** Kuehler, C. A. and Stime, C. M. (1974) "Effect of Enzimatic Hydrolysis on Some Functional Properties of Whey Protein". *Journal of Food Science* **39**: 379-382.

- 44.** Chen, S. H.; Swaisgood, H. E. and Foegeding, E. A. (1994) “Gelation of β -Lactoglobulin Treated with Limited Proteolysis by Immobilized Trypsin”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42** (2): 234-239.
- 45.** Britten, M. and Giroux, H. J. (1994) “Effect of pH During Heat Processing of Partially Hydrolyzed Whey Protein”. *Journal of Dairy Science* **77**: 676-684.
- 46.** Gonzalez-Tello, P.; Camacho, F.; Jurado, E.; Páez, M. P. and Guadix, E. M. (1994) “Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins. II Molecular-Weight Range”. *Biotechnology and Bioengineering* **44**: 529-532.
- 47.** Asselin, J.; Amiot, J.; Gauthier, S. F.; Mourad, W. and Hebert, J. (1988) “Immunogenicity and Allergenicity of Whey Protein Hydrolysates”. *Journal of Food Science* **53** (4): 1208-1211.
- 48.** Asselin, J.; Hebert, J. and Amiot, J. (1989) “Effects of In Vitro Proteolysis on the Allergenicity of Major Whey Proteins”. *Journal of Food Science* **54** (4): 1037-1039.
- 49.** Nakamura, T.; Sado, H. and Syukunobe, Y. (1993) “Production of low antigenic whey protein hydrolysates by enzymatic hydrolysis and denaturation with high pressure”. *Milchwissenschaft* **48** (3) 141-145.

- 50.** de Koning, P. J.; de Boer, R.; Both, P. and Nooy P. F. C. (1981) “Comparison of proteolysis in a low-fat semi-hard type of cheese manufactured by standard and by ultrafiltration techniques”. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **35**: 35-46.
- 51.** Jost, R.; Monti, J. C. and Hidalgo, J. (1976) “Natural Proteolysis in Whey and Susceptibility of Whey Proteins to Acidic Proteases of Rennet”. *Journal of Dairy Science* **59** (9): 1568-1573.
- 52.** Van Hekken, D. L. and Thompson, M. P. (1992) “Application of PhastSystem[®] to the Resolution of Bovine Milk Proteins on Urea-Polyacrylamide Gel Electrophoresis”. *Journal of Dairy Science* **75**: 1204-1210.
- 53.** Zalazar, C. A. (1994a) “Bioquímica de la maduración de quesos” *En Ciencia y Tecnología de los Productos Lácteos* CERIDE, Santa Fe, Argentina.
- 54.** Choisy, C.; Desmazeaud, M.; Gripon, J. C.; Lamberet, G.; Lenoir, J. y Colette Tourneur (1990) “Los fenómenos microbiológicos y enzimáticos y la bioquímica del afinado: Los enzimas coagulantes”. *En El Queso*. Coord. A. Eck. Ed. Omega, Barcelona, España.

- 55.** Schmidt, D. G. and van Markwijk, B. W. (1993) “Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Influence of heat treatment of α -lactoalbumin and β -lactoglobulin on their proteolysis by pepsin and papain”. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **47**: 15-22.
- 56.** Guo, M. R.; Fox, P. F. and Flynn, A. (1995) “Susceptibility of β -lactoglobulin and Sodium Caseinate to Proteolysis by Pepsin and Trypsin”. *Journal of Dairy Science* **78**: 2336-2344.
- 57.** FIL-IDF 20 B: 1993 “Determinazione del azoto totale nel latte” Norme FIL-IDF definizioni, metodiche di analisi e di prelievo del latte e derivati. Parte IIIa Reggio Emilia, Italia.
- 58.** Riordan, J. F. (1974) “Metal-Containing Exopeptidases”. En *Food Related Enzymes*. Edited by D. R. Whitaker. Published by American Chemical Society, Washington D. C.
- 59.** Hofmann, T. (1974) “Structure, Function, and Evolution of Acid Proteases”. En *Food Related Enzymes*. Edited by D. R. Whitaker. Published by American Chemical Society, Washington D. C.

- 60.** Zalazar, C. A. (1994b) “Coagulación de la leche y enzimas coagulantes” En Ciencia y Tecnología de los Productos Lácteos” CERIDE, Santa Fe, Argentina.
- 61.** Huck, J. y Zalazar, C. A. (1971/72) “Determinación de las condiciones óptimas de proceso para la producción industrial de cuajo en polvo. I: Estudios preliminares”. Revista de la Facultad de Ingeniería Química, 40/41, 183-184.
- 62.** Bozzetti, V.; Rampilli, M.; Geurts, T.; van den Berg, J.; Repelius, K. (1993) “Coagulando” Gist Brocades S p A. Casteggio, Italia, p. 120.
- 63.** Teuber, M. (1990) “Production of chymosin (EC 3.4.23.4) by microorganisms and its use for cheese making”. IDF Bulletin 251.
- 64.** Panari, G.; Corradini, C. (1993) “Contributo all’ individuazione dei caratteri nelle chimosina ottenute per fermentazione da microorganismi”. Scienza e Tecnica lattiero Casearia **44** (2): 97-105.
- 65.** Zalazar, C. A.; Meinardi, C. A. and Basualdo, S. (1995) “Comparison of chymosin produced by genetically modified microorganisms with other milk

- coagulants using Formagraph”. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* **13**: 183-189.
- 66.** Zalazar, C. A.; Meinardi, C. A. and Candiotti, M. C. (1994) “The effect of microbial proteases on Pategras cheese ripening”. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* **12**: 295-301.
- 67.** Schmidt, D. G. and Poll, J. K. (1991) “Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -lactoalbumin in buffer solutions by proteolytic enzymes” *Netherlands Milk and Dairy Journal* **45**: 225-240.
- 68.** Richardson, T.; Hyslop, D. B. (1993). “Enzimas”. En *Química de los Alimentos*. Director Fennema, O. R. Editorial Acribia S. A., Zaragoza, España.
- 69.** Gomori, G. (1955) “Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies”. En *Methods in Enzymology* Vol. 1. Edited by S. P. Colowick and N. O. Kaplan. Published by Academic Press Inc. New York.
- 70.** Zalazar, C. A.; Meinardi, C. A.; Rafaghelli, R. C.; Bernal, S. M. (1986) “L’azoto solubile nella maturazione dei formaggi: valutazione delle metodologie per la sua determinazione”. *Il Latte*, **11** (5): 422-423.

71. Gripon, J. C.; Desmazeaud, M. J.; Le Bars, D. et Bergere, J. L. (1975) "Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II - Influence de la presure commerciale". *Le Lait* **55**: 502-516.
72. Benedet, H. and Park, Y. (1982) "Sodium Dodecil Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of purified casein fractions treated with milk clothing enzymes" *Journal of Dairy Science* **65**: 899-901.
73. Weber, K. and Osborn, M. (1969) "The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis". *The Journal of Biological Chemistry* **244**: 406-412.
74. Laemmli, U. K. (1970) "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4" *Nature* **227** (8): 680-685.
75. Huang, X. L.; Catignani, G. L. and Swaisgood, H. L. (1994) "Comparison of the Size and Rate of Formation of Peptides Released by Limited Proteolysis of β -Lactoglobulins A and B with Immobilized Trypsin". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42** (6) 1281-1284.

- 76.** Ng-Kwai-Hang, K. F. and Kroeker, E. M. (1984) “Rapid Separation and Quantification of Major Caseins and Whey Proteins of Bovine Milk by Polyacrylamide Gel Electrophoresis”. *Journal of Dairy Science* **67**: 3052-3056.
- 77.** Ramos, P. R. R.; Hurtado, S. R. L.; Almeida, M. R. H.; Bortolozzi, J. and Silva, E. T. (1992) “An improved electrophoretic method for the determination of serum milk protein variants in Gyr-Holstein cows”. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **25**: 1107-1112.
- 78.** Código Alimentario Argentino Actualizado (1994) Art. 622 (Dec. 111, 12.1.76) De La Canal y Asociados S.R.L. Buenos Aires, Argentina.
- 79.** Zalazar, C. A.; Meinardi, C. A. y Candiotti, M. C. (1993) “Influencia de distintos aditivos sobre el rendimiento del queso cremoso argentino”. *Revista Argentina de Lactología* **5** (8) 65-73.
- 80.** Andrews, A. T. (1983) “Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins”. *Journal of Dairy Research* **50**: 45-55.
- 81.** FIL-IDF 4 A: 1982 “Formaggio e formaggio fuso. Determinazione de la materia seca. Metodo de riferimento”. Norme FIL-IDF definizioni, metodiche de analisi e di prelievo del latte e derivati. Parte IIIa Reggio Emilia, Italia.

- 82.** Dalgarrondo, M.; Dufour, E.; Chobert, J.; Bertrand-Harb, C. & Haertlé, T. (1995) “Proteolysis of β -Lactoglobulin and β -Casein by Pepsin in Ethanolic Media”. *International Dairy Journal* **5**: 1-14.
- 83.** Ortiz de Apodaca, M. J.; Amigo, L. and Ramos, M. (1994) “Study of the milk-clotting and proteolytic activity of calf rennet, fermentation-produced chymosin, vegetable and microbial coagulants”. *Milchwissenschaft* **49** (1): 13-16.
- 84.** Mulvihill D. M. and Fox, P. F. (1979) “Proteolytic specificity of chymosin on bovine α s1-casein”. *Journal of Dairy Research* **46**: 641-651.
- 85.** Grappin, R.; Rank, T. C. and Olson, N. F. (1985) “Primary Proteolysis of Cheese During Ripening. A Review” *Journal of Dairy Science* **68**: 531-540.
- 86.** Lo, C. G. and Bastian, E. D. (1998) “Incorporation of Native and Denatured Whey Proteins into Cheese Curd for Manufacture of Reduced Fat, Havarti-type Cheese”. *Journal of Dairy Science* **81**: 16-24.
- 87.** Zalazar, C. A.; Meinardi, C. A.; Candiotti, M. C.; Bernal, S. M. e Hynes, E. R. (1995) “La maduración del queso Cremoso Argentino”. *Revista Argentina de Lactología* **7** (11) 59-72.

- 88.** Qvist, K. B., Thomsen, D. and Hoier, E. (1987) “Effect of ultrafiltrated milk and use of different starters on the manufacture, fermentation and ripening of Havarti cheese”. *Journal of Dairy Research* **54**: 437-446.
- 89.** Vassal, L. (1997) “La influencia de factores tecnológicos y zootécnicos en la maduración de quesos. II- Factores ligados a la materia prima”. *Revista Argentina de Lactología* **9** (14): 55-74.
- 90.** Visser, S.; Slangen, K. J.; hu, G. and Stadhouders, J. (1983) “Bitter flavour in cheese. 3. Comparative gel-chromatographic analysis of hydrophobic peptide fractions from twelve Gouda-type cheeses and identification of bitter peptides isolated from a cheese made with *Streptococcus cremoris* strain HP”. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **37**: 181-192.