



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Determinación del nivel de actividad de plasmina en quesos
típicos argentinos

Bioq. Verónica G. Fernández

Trabajo de Tesis para acceder al Grado Académico de
Magíster en Ciencia de los Alimentos
de la Universidad Nacional del Litoral

Director: *Ing. Carlos A. Zalazar*

Co-Director: *Lic. Susana Bernal*

Trabajo realizado en el Programa de Lactología Industrial (PROLAIN) de la Facultad de
Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral.

Santa Fe, Marzo de 2004

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento al Ingeniero Carlos Zalazar, Director de mi tesis. Fue él quien me brindó la posibilidad de realizar este trabajo, y fueron sus conocimientos generosamente compartidos los que me orientaron en la investigación. Deseo agradecer igualmente a la Licenciada Susana Bernal, codirectora del trabajo, por su constante dedicación y apoyo personal durante todo este tiempo.

A todos los integrantes del Programa de Lactología Industrial (PROLAIN) de la Facultad de Ingeniería Química, por facilitar mis ensayos en el laboratorio en medio de su trabajo cotidiano. Y en particular, agradecer especialmente al Magíster Mario Candiotti y la Doctora Cristina Pierotti por su valiosa colaboración.

Al mismo Programa por haber financiado todos los recursos necesarios para el desarrollo de la tesis.

A mi compañera de cátedra Magister Silvina Sobrero, que me alentó permanentemente para que pueda realizar este trabajo.

A los integrantes del Jurado, por la disposición de su tiempo en la evaluación y los aportes realizados a la presente tesis.

Finalmente, a mis padres que, con sacrificio y dejando de lado necesidades personales, posibilitaron mi acceso a la educación superior, lo que me permite hoy concretar este nuevo paso.

RESUMEN

RESUMEN

En nuestro país la producción de quesos es el principal destino de la leche derivada en la elaboración de productos lácteos, constituyéndose la Argentina en el sexto productor mundial de quesos, ocupando el décimo lugar en el ranking como consumidor. En este sentido, motorizados por la continua expansión del consumo interno y externo, son continuos y crecientes los aportes realizados desde la investigación y el desarrollo a fin de profundizar el conocimiento de estos productos para mejorar y estandarizar su calidad.

Dentro de este contexto el presente trabajo desarrolla el estudio del complejo enzimático plasmina-plasminógeno en los quesos argentinos, constituyendo un paso más dentro de la comprensión de los procesos bioquímicos que ocurren en la maduración de los distintos tipos de quesos.

Se analizaron 14 muestras de quesos comerciales argentinos, 3 muestras de quesos elaborados en la planta piloto del PROLAIN, y una cuajada con la que se elaboró uno de estos quesos.

Estas muestras se distribuyeron en 4 quesos no cocidos, 6 semicocidos y 4 cocidos comerciales, y en 3 quesos cocidos experimentales, además de la cuajada.

Entre las diferentes metodologías existentes para la determinación de plasmina y plasminógeno en productos lácteos, se seleccionó una técnica colorimétrica basada en la acción enzimática de la plasmina sobre uno de los aminoácidos (lisina) de un tripéptido cromogénico, liberando del mismo p-nitroanilina la que se determina espectrofotométricamente a 390 nm. El cambio de color está directamente relacionado con la actividad de plasmina y plasminógeno presente en la muestra.

Se estudiaron las relaciones entre valores los valores encontrados del complejo enzimático en los distintos tipos de quesos con el pH de los mismos, con las variantes tecnológicas de elaboración de cada caso y con la actividad proteolítica de la plasmina sobre las caseínas a través de una electroforesis en gel de poliacrilamida adicionada de urea (UREA-PAGE).

Se encontró una diferencia significativa en el contenido de plasmina entre los tres tipos de quesos: no cocidos, semicocidos y cocidos, siendo en ese orden creciente el valor hallado para la concentración de la enzima.

En cuanto a los valores de plasminógeno obtenidos, analizados a través de la relación plasminógeno:plasmina, no se observó diferencia estadísticamente significativa en la relación encontrada entre los quesos no cocidos y los semicocidos, existiendo diferencia entre éstos y los quesos cocidos. La cuajada presentó una relación significativamente mayor que el queso reggianito experimental luego de 180 días de maduración.

Los valores obtenidos son coherentes con los procesos tecnológicos generales de elaboración de los quesos analizados. Asimismo hubo una muy buena correlación entre los valores de plasmina obtenidos y el índice de proteólisis de la caseína- β evaluada a través de la electroforesis PAGE y cuantificada por densitometría.

Estos resultados representan los primeros datos que se tienen sobre quesos argentinos, y resultan un aporte al mayor conocimiento de estos productos. Se plantea la necesidad de continuar los estudios a los efectos de determinar exactamente las condiciones tecnológicas óptimas de elaboración de los distintos tipos de quesos de manera tal de inhibir o estimular la acción de esta enzima según convenga para mejorar las características sensoriales.

ÍNDICE

INDICE

Agradecimientos

Resumen. I

Índice . IV

Capítulo I . INTRODUCCIÓN.....	1
I. 1. LA PRODUCCIÓN DE LECHE Y LA INDUSTRIA LECHERA EN LA ARGENTINA.....	2
I. 2. LA PRODUCCIÓN DE QUESOS EN ARGENTINA.....	4
I. 2. 1. El Producto.....	5
I. 2. 2. La producción.....	6
I. 2. 3. Consumo.....	8
I. 2. 4. Las exportaciones e importaciones.....	10
I. 2. 5. Importancia del desarrollo de conocimientos científicos acerca de los quesos argentinos para la industria nacional.....	11
Capítulo II . FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	13
II. 1. LA MADURACIÓN DEL QUESO.....	14
II. 2. ENZIMAS NATIVAS DE LA LECHE: TIPOS, DISTRIBUCIÓN, FUNCIONES BIOLÓGICAS Y LACTOLÓGICAS.....	20
II. 2. 1. Plasmina.....	20
II. 2. 2. Otras proteasas naturales de la leche.....	21
II. 2. 2. a. Cathepsina D o Proteasa Acida de la Leche.....	22
II. 2. 2. b. Trombina.....	22
II. 2. 2. c. Aminopeptidasas.....	23
II. 2. 2. d. Proteasas de los leucocitos presentes en la leche.....	23
II. 2. 3. Lipasa.....	24
II. 3. PROTEASA ALCALINA DE LA LECHE (Plasmina).....	24
II. 3. 1. Aislamiento de la plasmina de la leche.....	27
II. 3. 2. Sistema de la Plasmina en la leche.....	27
II. 3. 3. Activadores e inhibidores del plasminógeno en leche bovina .	28
II. 3. 4. Factores que afectan la actividad de plasmina en la leche.....	31

II. 4. PROTEÓLISIS DE LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE POR LA PLASMINA.....	33
II. 4. 1. Caseína- κ	33
II. 4. 2. Caseína- αS_2	33
II. 4. 3. Caseína- αS_1	34
II. 4. 4. Caseína- β	35
II. 4. 5. Acción sobre otras proteínas.....	39
II. 5. ESTABILIDAD AL CALOR DE LA PLASMINA.....	39
II. 6. EFECTOS DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LA PLASMINA SOBRE LAS PROPIEDADES DE LA LECHE Y LOS PRODUCTOS LÁCTEOS.....	41
II. 6. 1. Viscosidad.....	42
II. 6. 2. Contenido en nitrógeno soluble.....	42
II. 6. 3. Estabilidad al etanol.....	43
II. 6. 4. Estabilidad al calor de la leche.....	43
II. 6. 5. Cambios en la elaboración de quesos.....	44
II. 6. 6. Maduración de quesos.....	45
II. 6. 7. Gelificación de las leches UHT.....	49
Capítulo III . OBJETIVOS.....	51
III. 1. OBJETIVO GENERAL.....	52
III. 2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	52
Capítulo IV . MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
IV. 1. REVISIÓN DE LAS METODOLOGÍAS PROPUESTAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PLASMINA EN PRODUCTOS LÁCTEOS.....	55
IV. 1. 1. Método fluorométrico.....	55
IV. 1. 2. Enzimoanálisis (Inmunoabsorbentes ligados a enzimas – ELISA).....	56
IV. 1. 3. Método colorimétrico.....	59
IV. 2. MUESTREO DE LOS QUESOS ANALIZADOS.....	60
IV. 2. 1. Muestras seleccionadas.....	60
IV. 2. 2. Plan de muestreo.....	62

IV. 3. CARACTERÍSTICAS Y ADAPTACIONES DE LA METODOLOGÍA COLORIMÉTRICA SELECCIONADA PARA LA DETERMINACIÓN DE PLASMINA Y PLASMINÓGENO EN QUESOS.....	62
IV. 3. 1. Fundamentos teóricos de la determinación.....	62
IV. 3. 2. Metodología de la determinación.....	65
IV. 3. 3. Verificación de la longitud de onda de trabajo.....	67
IV. 3. 4. Preparación de las muestras de queso.....	70
IV. 3. 5. Curvas de calibrado.....	72
IV. 3. 5. a. Curva de calibrado con p-nitroanilina.....	72
IV. 3. 5. b. Curva de calibrado con plasmina.....	74
IV. 3. 6. Linealidad de reacción en el tiempo.....	75
IV. 4. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE UREA (UREA-PAGE).....	75
IV. 5. DENSITOMETRÍA.....	77
IV. 6. PROCESO DE ELABORACIÓN DEL QUESO REGGIANITO ARGENTINO EN LA PLANTA PILOTO DEL PROLAIN.....	78
IV. 7. DETERMINACIONES DE PH.....	79
IV. 8. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	79
Capítulo V . RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	81
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	82
V. 1. METODOLOGÍA COLORIMÉTRICA SELECCIONADA PARA LA DETERMINACIÓN DE PLASMINA Y PLASMINÓGENO EN QUESOS.....	83
V. 1. 1. Verificación de la longitud de onda de trabajo.....	83
V. 1. 2. Curva de calibrado con la solución de p-nitroanilina en el buffer de trabajo.....	84
V. 1. 3. Curva de calibrado con la solución de plasmina en el buffer de trabajo.....	86
V. 1. 4. Linealidad de la reacción en el tiempo.....	87
V. 2. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS EN QUESOS.....	88
V. 2. 1. Actividad de Plasmina en quesos comerciales argentinos.....	89
V. 2. 1. a. Quesos no cocidos.....	89
V. 2. 1. b. Quesos semicocidos.....	90
V. 2. 1. c. Quesos cocidos.....	91
V. 2. 2. Actividad de Plasmina en quesos Reggianitos Experimentales	

(180 días de maduración) elaborados en el PROLAIN.....	92
V. 2. 3. Representación gráfica de la actividad de plasmina en distintos tipos de quesos.....	94
V. 2. 4. Relación Plasminógeno:Plasmina en quesos comerciales argentinos.....	95
V. 2. 5. Variación de la actividad de Plasmina y Plasminógeno entre la cuajada y el queso al final de su maduración (180 días) para el Reggianito Experimental del PROLAIN.....	97
V. 2. 6. Determinación del pH en los distintos tipos de quesos.....	100
V. 2. 7. Análisis estadístico de los valores obtenidos.....	101
V. 2. 7. a. Comparación estadística entre quesos no cocidos y semicocidos.....	102
V. 2. 7. b. Comparación estadística entre quesos no cocidos y cocidos.....	103
V. 2. 7. c. Comparación estadística entre quesos Semicocidos y Cocidos.....	105
V.3. DISCUSIÓN.....	106
V. 3. 1. Actividad de plasmina y plasminógeno en quesos argentinos.....	106
V. 3. 2. Relación entre los valores de plasmina y el nivel de proteólisis primaria de las caseínas determinadas por electroforesis.....	114
Capítulo VI . CONCLUSIONES.....	124
CONCLUSIONES.....	125
ANEXOS.....	130
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	152

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I. 1. LA PRODUCCIÓN DE LECHE Y LA INDUSTRIA LECHERA EN LA ARGENTINA:

La industria lechera que, en nuestro país está sentada fundamentalmente en la zona pampeana, tiene una larga historia que se remonta al año 1.886 cuando en Palermo, en la exposición de la Sociedad Rural Argentina, fue exhibida por primera vez en el país una desnatadora de leche.

A partir de entonces, esta industria se constituyó en una de las actividades que lideraron el crecimiento de la industria nacional de alimentos y bebidas hasta el inicio de la recesión.

En la última década la producción nacional de leche aumentó el 45% sobrepasando los 10.000 millones de litros en 1999. Cabe acotar que si bien en 1.999 la producción total llegó a 10.328,8 millones de litros, en el 2.000 decayó alcanzándose los 9.816,7 millones de litros. La tasa de crecimiento fue del 9 % anual entre 1991 y 1995 y del 3% anual entre 1995 y 1998 (Fig.I.1). El país ocupa el decimocuarto lugar en el ranking mundial, participando con el 2% de la producción total, detrás de países como Estados Unidos con 76.000 millones de litros, India con 36.000 millones de litros y Rusia con 32.000 millones.

En el mismo período, el incremento del consumo doméstico y la puesta en marcha del MERCOSUR alentaron importantes inversiones para modernizar el sector, las que rondaron los 1.300 millones de dólares, duplicándose la capacidad instalada de las plantas elaboradoras de leche en polvo, primer rubro de las exportaciones lácteas argentinas.

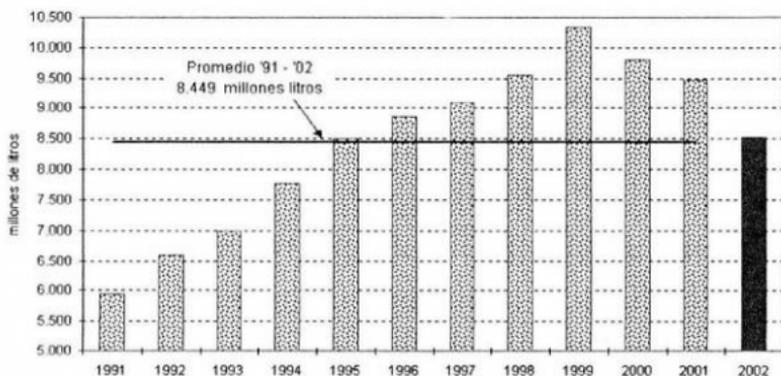


Fig. I.1. Evolución de la producción de leche en Argentina. 2003.

Fuente: Convenio Lechería S.A.G.P.y A.- CIL-FIEL. //Elaboración: LACTEOS. Dirección Industria Alimentaria.

Las transformaciones en la actividad siguieron una tendencia mundial orientándose hacia la concentración de capital lo que se tradujo en una producción con menor número de tambos, rodeos más grandes y mayor rendimiento por tambo y por vaca.

En un contexto mundial caracterizado por el aumento de leche en polvo entera y quesos, la estabilidad de la producción de leche en polvo descremada y cierta disminución de la producción de manteca, la Argentina ocupa el sexto lugar como productor de leche en polvo entera, el séptimo en quesos, el decimoséptimo en manteca, y el decimoctavo en leche en polvo descremada.

Si bien en los últimos años la industria se orientó hacia productos de mayor valor agregado, pasando la relación productos / leches fluidas de 2,5 en 1.992 a 3,20 en 1.998, la participación de la Argentina en el mercado internacional de commodities lácteos registró en el último quinquenio un alza de cuatro puntos

porcentuales en la participación de leche en polvo a expensas de las exportaciones de queso y en menor medida de manteca.

I. 2. LA PRODUCCIÓN DE QUESOS EN ARGENTINA:

En nuestro país, la producción de quesos constituye el principal destino de la leche utilizada en la elaboración de productos lácteos. Esto significó, por ejemplo, que en el año de 2.001 de la leche salida de tambo dedicada a la elaboración de productos, que representa el 74,9% del total de leche producida, el 36,7 % se haya empleado en la elaboración de quesos. Ello representó 430.955 toneladas de quesos, por un valor bruto de 1.628 millones de pesos y un consumo de 11,17 Kg / hab. / Año (Fig.I.2). Los quesos están muy arraigados en nuestros hábitos alimenticios, lo que permite explicar el elevado nivel de consumo con relación a los ingresos de la población. En este sentido, los números son contundentes: Argentina es el sexto productor mundial de quesos con el 3% del total y ocupa el décimo lugar en el ranking como consumidor.

Motorizados por la continua expansión del consumo interno, en la última década, la industria láctea en general y el sector elaborador de quesos en particular, se embarcaron en un proceso de inversiones permanentes y desarrollo de innovaciones que delinearon su perfil como uno de los sectores más dinámicos del rubro alimenticio.

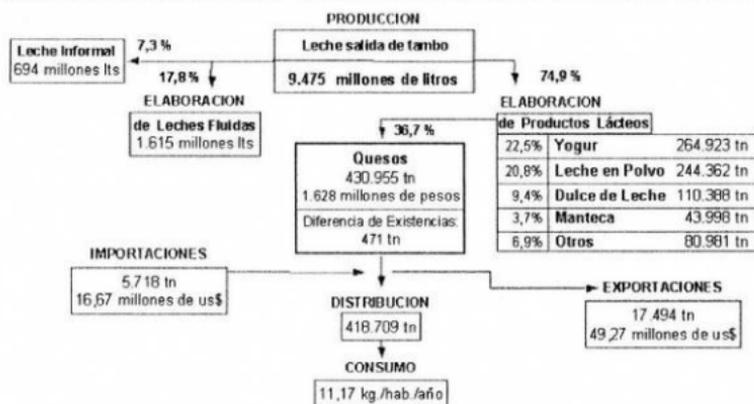


Fig.1.2. Diagrama de Producción y consumo de quesos en Argentina. 2001. (Fuente: S.A.G.P. y A.)

I. 2. 1. El Producto:

“Con la denominación **queso** se entiende el producto fresco o madurado que se obtiene por separación del suero de la leche o de la leche reconstituida – entera, parcial o totalmente descremada-, coagulada por acción del cuajo y/o enzimas específicas. Se puede complementar con bacterias específicas o ácidos orgánicos y agregar sustancias colorantes, especias o condimentos”. (Código Alimentario Argentino, Decreto Nro. 111, 12.1.76 art. 605).

De acuerdo al contenido en materia grasa del extracto seco de la pasta, los quesos se clasifican en: doble crema, grasos, semigrasos, magros y de leche descremada.

Según el tipo de maduración y el contenido de agua de la pasta, se clasifican en: pasta blanda o quesos frescos (45% -55%), pasta semidura (36%-44%) y pasta dura (27%-35%) .

El Código Alimentario incluye dentro de los quesos de pasta blanda a : queso Blanco Argentino, Ricotta, Petit Suisse Argentino, Neufchatel Argentino, Mascarpone Argentino, Mozzarella Argentino, Caccio Argentino, Queso Crema,

Cuartirollo, Cremoso, Brie Argentino, Camembert Argentino, Limburgo o Romadur Argentino, Por Salut o St. Paulin Argentino, Criollo, Gorgonzola Argentino, Roquefort Argentino. Estos quesos son todos de masa cruda, con excepción de los quesos Por Salut y Criollo que son de masa semicocida, y tienen en su mayoría un período de estabilización o maduración comprendido entre 24 horas y 20-30 días, siendo los que tienen mayor tiempo el Gorgonzola y Roquefort con un período de 3 y 2 meses respectivamente.

Quedan comprendidos por el Código Alimentario Argentino como quesos de pasta semidura los siguientes: Gruyere y Emmenthal Argentino, Colonia o Fontina Argentino, Pategrás o Gouda Argentino, Holanda o Edam Argentino, Cheddar Argentino, Danbo, Fynbo y Samsoc Argentino, Tybo Argentino, y Cacciocavallo Argentino. Con excepción de los quesos Gruyere y Emmenthal que son de masa cocida, el resto de los quesos son de masa semicocida, y todos tienen un período de maduración que se encuentra entre el mes y los tres meses .

Dentro de los quesos de pasta dura se encuentran : Parmesano, Reggiano y Reggianito Argentino, Sbrinz Argentino, Sardo y Romano Argentino, Provolone Argentino. El Provolone es de masa semicocida, los otros quesos son todos de masa cocida, todos tienen un período de maduración comprendido entre los tres y dieciocho meses.

A partir del enero de 1.995 tiene aplicación en nuestro país la Resolución Número 79/94 fijada por el Grupo Mercado Común del MERCOSUR consistente en el "Reglamento Técnico General Mercosur de Identidad y Calidad de Quesos".

1.2. 2 . La producción :

Según estimaciones de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), en 1.999 la elaboración mundial de quesos fue de 15,5

millones de toneladas, siendo el principal productor Estados Unidos con el 25 % del total de la producción, seguido por Francia, Alemania, Italia, Países Bajos y Argentina con 443.000 de toneladas.

La producción mundial de quesos creció en forma sostenida . Entre 1995 y 1999 lo hizo a una tasa acumulativa anual del orden del 1,5%, superior a la registrada en la producción primaria de leche . Esto se relaciona con la mayor demanda y con el cambio de estrategia del principal bloque productor: la Unión Europea . Ante la imposición de cuotas de producción de leche, sus miembros disminuyeron la elaboración de commodities (leche en polvo y manteca) y se orientaron hacia lácteos con mayor valor agregado (quesos) en los que son comparativamente más competitivos.

La FAO observó que las exportaciones mundiales de quesos alcanzaron en 1.998 los 3 millones de toneladas, por un monto total de 11.000 millones de dólares. Este mercado mundial es dominado por la Unión Europea, que a través de subsidios ha alcanzado y mantenido ese liderazgo. Las distorsiones generadas por los subsidios llevaron a varios competidores a instrumentar una serie de herramientas para contrarrestarlos, lo que distorsionó aun más el mercado. Excluyendo el mercado intracomunitario, las exportaciones se reducen a 1,2 millones de toneladas, siendo los principales exportadores Nueva Zelandia, Australia y Francia; estando Argentina en el undécimo lugar con alrededor del 2% del total .

Como ya se mencionó, en la Argentina el destino principal de la leche utilizada para la elaboración de productos lo constituyen los quesos, habiendo crecido la producción anual durante la década de los '90 a una tasa del 4%. Durante este período se expandió la elaboración de los quesos blandos (tasa acumulativa período 1.990 / 99 del 6% anual) a expensas de los semiduros. Los

quesos blandos ocupan el primer lugar en el ranking de elaboración con el 55%, seguidos por los de pasta semidura con el 30%, mientras que los de pasta dura y fundidos tienen una participación promedio del 14% y del 2% del total de quesos respectivamente (Fig. I.3).

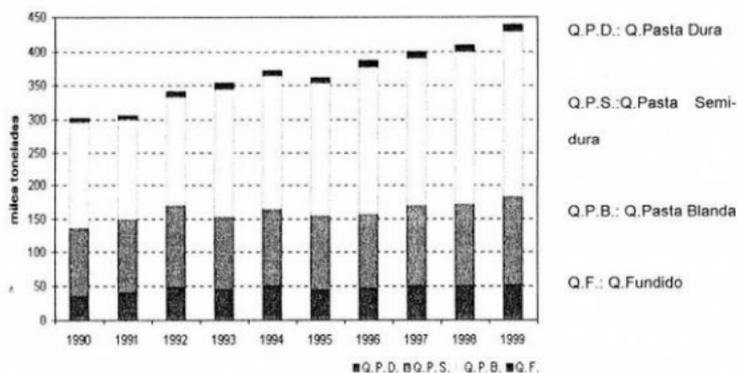


Fig. I.3. Elaboración Argentina de Quesos.

Fuente: Lácteos. Dirección Industria Alimentaria -S.A.G.P.yA

I. 2. 3. El consumo:

El consumo mundial de quesos se presenta en un sostenido ascenso debido al crecimiento de la población, los cambios en los hábitos alimentarios y la expansión de las comidas rápidas.

Como se dijo, la Argentina se ubica entre los primeros países del mundo con relación al consumo de quesos. Este se expandió a una tasa del 3% anual per cápita, entre 1.990 y 1.999. Este crecimiento, también en Argentina, fue a gracias casi en un 75% al incremento en el consumo de los quesos blandos, mientras que los duros y semiduros solo aportan un 10% cada uno (Fig. I.4).

El queso es un producto que responde perfectamente a las modernas tendencias del consumo: es un alimento saludable y completo: contiene proteínas,

un nivel de grasa aceptable, calcio, fósforo, vitaminas A, B y D; es adecuado para múltiples usos en gastronomía y de atractivo sabor.

Analizando las tendencias del consumo por pasta, se observa una disminución relativa de la participación de los quesos duros y semiduros –aunque siguen siendo los más importantes del mercado con casi el 50% del volumen- y un crecimiento notable en el consumo de los quesos blandos. Se puede justificar este comportamiento por su menor precio, el fuerte crecimiento del consumo de la mozzarella (introducción de la pizza en la dieta diaria y en las comidas rápidas), y su adaptabilidad a las mayores exigencias dietéticas y nutricionales (Fig.1.5).

La evolución de los precios al consumidor presentó en la última década dos etapas bien diferenciadas: el primer quinquenio con una rápida y continua mejora de los valores, y el período 95-99, caracterizado por la estabilización e incluso la caída de los mismos.

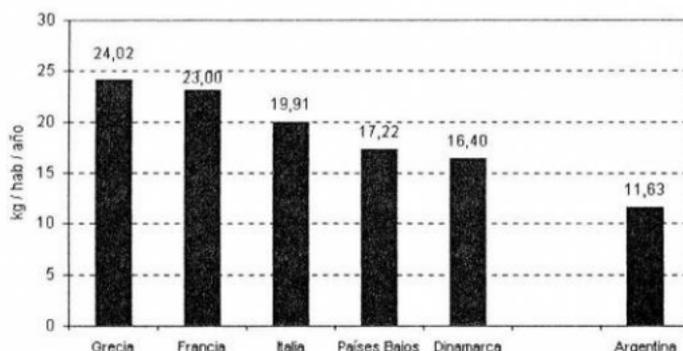


Fig.1.4. Consumo Mundial per Cápita de quesos. 2000.

Fuente: S. A. G. P. y A.

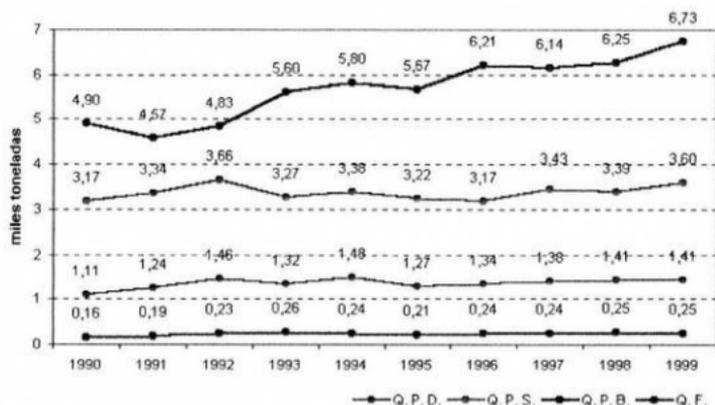


Fig.1.5. Consumo Argentino per cápita de quesos. 2000.

Fuente: S. A. G. P. y A.

I. 2. 4. Las exportaciones e importaciones:

Como ya se mencionó los quesos se destinan principalmente al mercado interno. En la década 1990-1999 las exportaciones argentinas promediaron el 3,5% de la producción. La relación exportación / producción pasó de un máximo del 7% en 1990 (hiperinflación) a un mínimo cercano al 1% en 1992, etapa de la plena expansión del consumo interno. Recién en los últimos tres años las ventas externas se estabilizaron en el orden del 4-5%, en un contexto de consumo creciente.

La exportación alcanzó en el 2.000 un record de 24.603 toneladas, lo que significó un ascenso del 10 % en relación con el año precedente, representando algo más de 58 millones de dólares.

Aunque nuestro país vende unos 40 tipos de quesos, los tres más importantes son el Cremoso, el Pategrás, y el Port Salut que suman el 65% del volumen total.

En 1.998 la Argentina exportó quesos a cerca de 20 países, aunque sólo 8 de ellos tuvieron una participación mayor al 1% del total. Brasil, Estados Unidos y México recibieron el 80% del volumen total exportado. Específicamente en quesos blandos, Brasil acaparó más del 75% de las toneladas vendidas. El principal destino de los quesos duros es tradicionalmente Estados Unidos (75% del volumen en 1.999), mercado en el que nuestro país tiene asignada una cuota desde hace varios años.

En cuanto a las importaciones, cabe decir que en el año 2.000 se presentó una baja, siendo la misma de 7.929 toneladas frente a las 8.639 importadas en 1.999, año que, por otra parte, fue record en importación para el período 1990 - 2000.

Alrededor del 60% del volumen importado en 1.999 correspondió a quesos semiduros, seguidos en un 20 % por los fundidos y en un 17% por los blandos. Casi la mitad de las compras externas de quesos correspondieron a embarques de productos semiduros provenientes del Uruguay.

1.2. 5. Importancia del desarrollo de conocimientos científicos acerca de los quesos argentinos para la industria nacional:

Debido a que el principal destino de la leche fluida en la Argentina es la producción de quesos, el aumento de la producción total de litros de leche que se dio en la última década significó también un incremento de la producción de quesos, ubicándose así la Argentina entre los principales productores, exportadores, y consumidores a escala mundial.

En virtud de la relevancia que ha adquirido la industria quesera argentina tanto en el orden mundial como en el consumo interno, resultan de fundamental trascendencia los aportes que desde la investigación y el desarrollo se puedan

realizar a fin de incrementar el conocimiento científico de estos productos para mejorar y estandarizar su calidad de manera tal de ir produciendo quesos con características que contribuyan a generar una Marca argentina y Marcas regionales, es decir, denominaciones de origen certificadas, que estimulen su consumo en el mercado internacional.

Desde este punto de vista se viene trabajando en el Programa de Lactología Industrial (PROLAIN) de la Facultad de Ingeniería Química, desarrollando importantes proyectos de investigación sobre el tema y un proceso de capacitación permanentemente de profesionales para la obtención de títulos de post-grado. Esto ha permitido que recursos humanos especializados se hayan insertado en el sector elevando el nivel del mismo.

Dentro de este contexto, el estudio de la actividad del complejo enzimático plasminógeno-plasmina presente en los quesos argentinos se constituye en un paso más dentro de la comprensión de los procesos bioquímicos que se dan en la maduración de los quesos, ya que para los quesos incluidos en el presente trabajo no existe ninguna información sobre el tema, lo que abre un campo de estudio en la posibilidad de incidir tecnológicamente a fin de mejorar la etapa de maduración de los distintos tipos de quesos.

La determinación del nivel de la actividad de plasmina en quesos típicos argentinos a través de una metodología que será convenientemente seleccionada y adaptada, constituye el eje del presente trabajo de tesis.

Capítulo II

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

II. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

A continuación se llevará a cabo una revisión de los principios teóricos que sustentan el desarrollo del presente trabajo de tesis, como asimismo un análisis de los conocimientos que sobre el tema se poseen en la actualidad.

II. 1. LA MADURACIÓN DEL QUESO:

El 75% de la producción de queso a nivel mundial es madurada durante períodos que van desde pocos días (Ej. Mozzarella) hasta más de dos años (Ej.: parmesano, cheddar extramaduro). En el proceso de maduración se cumple una serie compleja de eventos bioquímicos y químicos, que son responsables de otorgar las diversas características de sabor, aroma, y textura en cada variedad de queso.

La maduración comprende tres acontecimientos bioquímicos primarios, la glicólisis de la lactosa residual y sus constituyentes monosacáridos, glucosa y galactosa, la lipólisis de la materia grasa y la proteólisis de las caseínas.

Dependiendo de la variedad, los productos primarios de estas reacciones son modificados en mayor o menor medida. El ácido láctico puede ser isomerizado o puede convertirse en ácido acético, propiónico (Suizo) o butírico (Suizo, Dutch), CO₂ (Suizo, Camembert), H₂O, o H₂ (Suizo, Dutch) El ácido cítrico es convertido en diacetilo y CO₂ (Dutch) o en ácido fórmico. Los ácidos grasos pueden ser oxidados a 2-alcanonas que pueden ser reducidas a 2-alcanol (quesos azules). Los aminoácidos pueden ser desaminados, transaminados, decarboxilados, desulfurados, o convertidos a alcoholes. (Fox, P.F., Mc Sweeney, P.L.H., 1.996).

La proteólisis es el más complejo y el más importante de los tres eventos primarios que se dan durante la maduración del queso. El sustrato de estas

reacciones lo constituyen las caseínas, las que según su estructura primaria se las identifica como caseína- α_1 , caseína- α_2 , caseína- β y caseína- κ , en proporción 3:1:3:1 . Cada una tiene sub-fracciones según el grado de fosforilización y los grupos glucósidos que contienen. Estas caseínas representan el 99% de las proteínas en la mayoría de los quesos, siendo el 1 % restante proteínas de suero y otras proteínas menores, variando estos porcentajes según el tipo de quesos (Grappin, R., Rank, T.C., Olson, N.F., 1.985) .

Como consecuencia de la proteólisis se producen en la masa del queso las siguientes modificaciones :

1. Cambio de la textura por medio de:

1.a. La desintegración de la red de proteínas.

1.b. La disminución de la actividad de agua a través del agua ligada por los grupos amino y carboxilos liberados.

1.c. El incremento del pH debido a la producción de NH_3 por desaminación de aminoácidos libres.

2. Contribución directa a los caracteres organolépticos (péptidos, amino ácidos) y quizás caracteres organolépticos desagradables (especialmente el amargo debido a péptidos hidrofóbicos).

3. Liberación de sustratos (aminoácidos) para otras reacciones generadoras de caracteres organolépticos (Ej.: desaminación, descarboxilación, desulfuración).

4. Liberación de compuestos de sabor durante la masticación (Mc Sweeney P.L.H, Sousa, M.J., 1998).

La proteólisis que se produce durante la maduración es llevada a cabo por las enzimas del coagulante, que queda retenido en la cuajada y actúa posteriormente en el queso (quimosina, pepsina, proteinasas ácidas de hongos,

etc.), por las enzimas naturales de la leche (plasmina, catepsina D y otras proteasas de las células somáticas), por las enzimas de las bacterias del starter, o de la microflora del no starter (microflora accidental), y del inóculo secundario (hongos, bacterias y levaduras).

En forma sintética, en el proceso de proteólisis del queso la hidrólisis inicial de la caseína es producida primeramente por el coagulante residual y, en menor extensión, por la plasmina y tal vez la cathepsina D y otras proteinasas de las células somáticas, resultando en la formación de péptidos intermedios y largos. Estos son posteriormente degradados por las enzimas de la flora del starter y del no-starter. La producción de pequeños péptidos y aminoácidos libres resulta de la acción de peptidasas y proteinasas bacterianas. Este proceso general se puede modificar según cada variedad de queso y según los diferentes métodos de elaboración de los mismos (Mc Sweeney P.L.H, Sousa, M.J., 1998).

La mayoría de las proteinasas tienen una acción hidrolítica sobre la caseína- α_{s1} . La acción principal sobre esta caseína la tiene el cuajo (quimosina) que actúa en la etapa inicial de la maduración siendo el sitio primario de acción en la posición Phe₂₃-Phe₂₄. La hidrólisis de esta unión parece ser responsable del ablandamiento de la textura del queso, dando como principal producto de degradación el péptido α -S₁-I (Phe₂₄-Trp₁₉₉), que está presente en la mayoría de los quesos. Las proteinasas naturales de la leche juegan un rol importante en la proteólisis de la caseína- α_{s1} en aquellos quesos donde el cuajo queda inactivado por las altas temperaturas o cuando se elimina prácticamente todo la quimosina y/o pepsina de la cuajada al incrementar el pH en el cuajo-suero a aproximadamente 7 luego de la coagulación (Fox, P.F., Mc Sweeney, P.L.H., 1.996). La hidrólisis de la caseína- α_{s1} , que depende del contenido de humedad en el salado (sal-humedad) y del pH, es totalmente degradada cuando la relación

sal/humedad es del 4% mientras que se hidroliza un 40 % cuando esta relación es del 8%.

La caseína- β a pH 6,5 es hidrolizada por la quimosina dando los péptidos β -I (1-139), β -II (140-167) y β -III (167-189). Esta hidrólisis es dependiente del pH y la concentración de NaCl. En solución acuosa el NaCl tiene un fuerte efecto inhibitorio sobre la quimosina, efecto que disminuye con el descenso del pH de 7 a 4,6. Las proteinasas naturales de la leche también hidrolizan la caseína- β , la ácida lo realiza en forma similar a la quimosina produciendo los péptidos β -I y β -II a pH 5,5 (Kaminogawa y col. 1980); la plasmina la hidroliza a caseínas- γ . Se comprobó que en los quesos blandos esta acción hidrolítica también depende del pH y de la concentración de NaCl (Noomen, 1978). Por otra parte, se comprobó que las proteasas del starter contribuyen a la degradación de la caseína- β . Visser y Groot-Mostert (1977) encontraron que el starter (*S.cremoris*) produjo el 10% de hidrólisis de la caseína- β comparado con el 40% de la acción del cuajo al final del período de maduración. La aspartil proteinasa (*P. caseicolum* y *P. roqueforti*) son muy activas frente a la caseína- β .

La caseína- α_2 es resistente a la acción de la quimosina. A pH 7,8 es totalmente degradada por la plasmina dando bandas de elevada movilidad electroforética y bandas difusas en dirección a la carga negativa (ánodo).

La para-K-caseína es resistente a la hidrólisis durante la maduración del queso.

Las proteínas del suero, tales como la α -lactalbúmina, β -lactoglobulina y albúmina sérica bovina, son resistentes a la acción de proteinasas, por ejemplo, en el queso Cheddar y en quesos semicocidos de leche ultrafiltrada.

También puede utilizarse en la elaboración de quesos pepsina bovina como enzima coagulante, teniendo esta enzima una acción residual con mayor

poder proteolítico que la quimosina durante el proceso de maduración . Otras enzimas coagulantes usadas son las provenientes de microorganismos: *Rhizomucor pusillus*, *R. miehei* (más resistente al calor que la quimosina) y *Cryphonectria parasítica*, teniendo estas enzimas un poder proteolítico muy elevado, mayor al de la quimosina, y su acción es principalmente sobre la caseína- β . (Fox, P.F., Mc Sweeney, P.L.H., 1.996; Grappin, R., Rank, T.C., Olson, N.F., 1.985) .

El rol que le cabe a las enzimas nativas, y dentro de ellas a la plasmina, no ha tenido tanta atención en general y es prácticamente inexistente la información acerca de quesos argentinos.

La figura II.1 esquematiza las líneas generales del proceso de maduración de quesos.

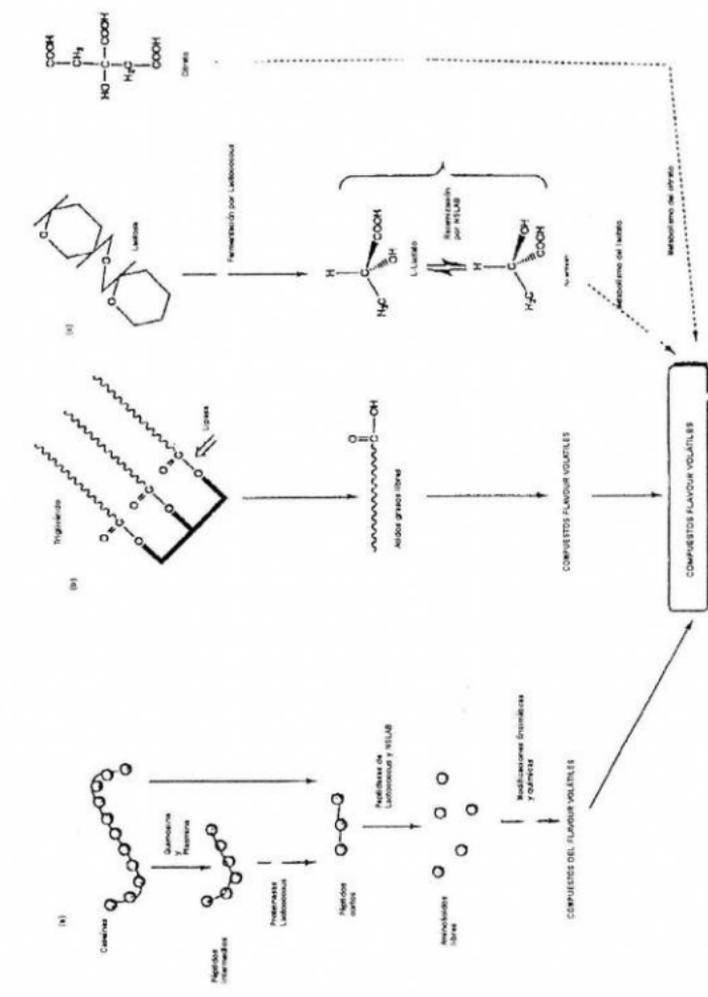


Fig. II.1. Procesos bioquímicos generales en la maduración del queso: (a) proteólisis, (b) lipólisis (c) metabolismo de lactosa, lactato y citrato. (McSweeney, P.L.H. y Sousa, 1998)

II. 2. ENZIMAS NATIVAS DE LA LECHE: TIPOS, DISTRIBUCIÓN, FUNCIONES BIOLÓGICAS Y LACTOLÓGICAS:

La leche bovina contiene aproximadamente 60 enzimas naturales (Fox, P.F., Stepaniak, L. 1993), algunas de las cuales se encuentran en el suero, otras asociadas a la micela de la caseína, a la membrana del glóbulo graso o a partículas microsomales.

Estas enzimas provienen de tres fuentes principales: a- de la sangre o de otros órganos del animal por vía sanguínea, b- secretadas desde el citoplasma celular, algunas de las cuales quedan retenidas en los glóbulos grasos por la membrana de los mismos, c- de la misma membrana del glóbulo graso, la capa externa de la cual es derivada de la membrana apical de las células secretorias de la glándula mamaria.

Los niveles y/o la actividad de la mayoría de las enzimas en la leche se incrementan durante el período de lactancia y durante una mastitis ya que aumenta la permeabilidad de las membranas de las células secretorias de la glándula mamaria (Grufferty, M.B., Fox, P.F. 1.988a).

II.2.1. Plasmina:

Entre las enzimas naturales de la leche bovina la más estudiada es la "proteasa alcalina de la leche o plasmina (EC 3.4.21.7)" .

Como la proteasa alcalina aislada de la leche y la plasmina aislada de la sangre bovina son similares con relación a poseer un mismo pH óptimo, igual estabilidad al pH, la misma sensibilidad al calor y a varios inhibidores, el mismo peso molecular y la especificidad proteolítica sobre la caseína, se considera que la plasmina sanguínea y la proteasa alcalina de la leche son idénticas (Grufferty, M.B., Fox, P.F., 1.988a).

El rol fisiológico de la plasmina es la solubilización del coágulo de fibrina. Pertenece a un sistema complejo consistente en: la enzima activa, su precursor inactivo el plasminógeno, los activadores del plasminógeno y los inhibidores de la enzima, y de los activadores del plasminógeno, todos estos presentes en la leche. La plasmina, el plasminógeno, y los activadores del plasminógeno están asociados con la micela caseica en la leche, mientras que los inhibidores lo están en el suero (Fox, P.F., y Mc Sweeney, P.L.H., 1996).

En cuanto a la actividad proteolítica de la plasmina sobre las proteínas de la leche, es activa sobre todas las caseínas, pero especialmente su acción es sobre las caseínas- α_{s2} y β , es menos activa sobre la caseína- α_{s1} y mucho menos activa sobre la caseína- κ .

Esta enzima nativa por ser de importancia fundamental para el presente trabajo de tesis, será objeto de un estudio más detallado en el punto II.3 .

II. 2. 2. Otras proteasas naturales de la leche:

Se ha informado que en menor grado de importancia otras enzimas naturales de la leche, incluyendo la trombina y la lisina aminopeptidasa, provenientes de las células somáticas, pueden también contribuir a la proteólisis en el queso (Fox, P.F. , Mc Sweeney, P.L.H. 1996).

Andrews (1983a) observó que no toda proteólisis en la leche durante el almacenamiento puede ser inhibida por el inhibidor de la plasmina (SBTI), indicando la presencia de proteasas distintas a la plasmina. Andrews y Alichanidis (1983) también sugirieron la presencia de otras enzimas naturales en la leche, al comparar las fracciones peptídicas que aparecían de la acción directa de la plasmina sobre las caseínas y las que aparecían en una leche almacenada. En este último caso encontraron que de una fracción peptídica (PP) de 38

péptidos, sólo 25 podían atribuirse a la acción de la plasmina sobre las caseínas, por lo que otras proteasas serían las responsables de los 13 péptidos remanentes.

II. 2. 2. a. Cathepsina D o Proteasa Ácida de la Leche:

Esta proteasa ácida natural de la leche ha sido poco estudiada. Se considera que tiene una actividad similar a la proteasa ácida lisosomal, la Cathepsina D (EC 3.4.23.5) (Fox, P.F., 1.993; McSweeney, P.L.H. y col., 1995). Es relativamente lábil al calor, se inactiva completamente a una temperatura de 70° C durante 10 minutos, su pH óptimo es de 4; su peso molecular aproximado es de 36.000 Dalton, no es inhibida por el etilendiaminotetracético (EDTA), el ácido iodoacético o diisopropilfluorofosfato (DFP). Estas propiedades son similares a la Cathepsina D (Fox, P.F., 1.993) . Es muy estable a pH 3,5 a 30° C durante tres horas . La caseína- α S₁ es más susceptible a la proteasa ácida de la leche que la caseína- β . La acción específica sobre las caseínas no ha sido muy estudiada, pero algunas investigaciones indican que tiene una especificidad muy similar a la quimosina. Si bien los productos de degradación que se obtienen sobre la caseína individual son similares por la acción de ambas enzimas, las velocidades de acción son muy diferentes. Ambas enzimas pueden estar activas durante la maduración del queso (Grufferty, M.B., y Fox, P.F, 1.988).

II. 2. 2. b. Trombina:

Reimerdes (1983) aisló dos serina proteasas de la leche: la proteasa I de la leche y la proteasa II de la leche. La plasmina y la proteasa I de la leche fueron halladas idénticas por varios criterios. La proteasa II preferentemente hidrolizó la L-benzoyl-arginina 4-nitroanilina y que como la trombina, hidroliza péptidos

conteniendo arginina. Reimerdes sugirió que la proteasa II de la leche puede ser trombina, y ésta puede causar una significativa proteólisis en la leche (Grufferty, M.B., y Fox, P.F. 1988).

II. 2. 2. c. Aminopeptidasas:

Reimerdes (1983) informó la existencia de aminopeptidasas en suero de leche con actividad específica por la 4-nitroanilina de la alanina, leucina y lisina. Comparando la leche con el suero sanguíneo de varios animales se observan patrones de proteólisis muy similares, excepto que la concentración de enzima en la sangre es mucho mayor que en la leche, sugiriendo este hecho que la aminopeptidasa de la leche puede tener su origen en la sangre (Grufferty M.B. y Fox, P.F. 1988).

II. 2. 2. d. Proteasas de los leucocitos presentes en la leche:

El significado de las proteasas de los leucocitos presentes en la leche fue examinado por Grieve y Kitchen (1985) en momentos en que estas células están aumentadas en la leche, especialmente en los procesos infecciosos durante una mastitis. Los investigadores demostraron que la actividad proteolítica de la plasmina natural es entre 2 a 8 veces mayor que la de los leucocitos aislados de la sangre y adicionados a un caseinato. La electroforesis en gel mostró que los leucocitos aislados de la sangre hidrolizan la caseína según el siguiente orden $\alpha S_1 > \beta > \kappa$, en contraste con la plasmina que hidroliza caseína- $\beta > \alpha S_1 > \kappa$ (Grufferty M.B. y Fox, P.F. 1988).

II. 2. 3. Lipasa:

Durante muchos años, la lipoproteína lipasa fue la más importante tecnológicamente de las enzimas nativas de la leche. La enzima ha sido aislada y bien caracterizada (Olivecrona, y Bengtsson-Olivecrona, 1992) . El nivel de lipasa en leche es tal que si estuviese totalmente activa podría causar la hidrólisis de los ácidos grasos y la rancidez en 10 segundos. Esto no ocurre porque la lipasa está normalmente asociada a la micela de caseína y está aislada de su sustrato por la membrana del glóbulo graso.

Una pequeña lipólisis ocurre en algunas variedades de quesos, por ejemplo Cheddar, Suizo. Sin embargo los quesos extra-maduros muestran una considerable lipólisis y el impacto sobre los caracteres organolépticos es balanceado por los productos de la proteólisis y posiblemente de la glicólisis.

La lipasa de la leche es relativamente estable al calor, se necesita un tratamiento térmico de 78° C durante 15 segundos para inactivarla totalmente. Por ello puede presentarse cierta lipólisis cuando se utiliza leche pasteurizada en la elaboración del queso, o más aún cuando son usadas condiciones de sub-pasteurización. Por otro lado el pH de los quesos (~ 5.1) no es el óptimo de acción para la lipasa que es de pH 9.0. (Fox, P.F. , y Stepaniak, L., 1993).

II. 3 . PROTEASA ALCALINA DE LA LECHE (PLASMINA):

La plasmina (fibrinolisisina, EC 3.4.21.7) es una serina proteasa con actividad similar a la tripsina, es altamente específica para péptidos ligados a la lisina, y en menor grado a la arginina del grupo carboxilo terminal (Fox, P.F., Mc Sweeney, P.L.H., 1996). Es enérgicamente inhibida por el diisopropilfluorofosfato (DFP), el Cu, Zn, Hg, el ácido α -aminocaproico, β -lactoglobulina y los inhibidores de la tripsina, como por ejemplo los inhibidores de la tripsina de soja (SBTI). Así,

la proteólisis de la leche durante su almacenamiento a 37°C debido a la plasmina nativa, es inhibida por los inhibidores de la tripsina de soja (Grufferty, M.B. y Fox, P. F. 1988). Es parcialmente inhibida por el Ca, el Mg, clorometilcetona. La plasmina no es inhibida por el ácido etilendiaminotetraacético o el iodoacetato, (Fox, P.F., 1.993).

El mayor porcentaje de la plasmina (85-90%) en la leche bovina existe como plasminógeno (relación plasminógeno/plasmina 6-9:1) encontrándose la media de concentración de plasmina en leche alrededor de 0,22-0,5 mg/l según la raza de la vaca. El plasminógeno puede ser activado por la uroquinasa (EC 3.4.21.31) y activadores naturales.

La plasmina está asociada a la micela caseínica de la leche y permanece asociada a ella en la caseína la enzimática (pk- caseína, caseína obtenida por el cuajo) o en la micela de caseína preparada por centrifugación. El plasminógeno también está asociado con la micela de la caseína (Grufferty, M.B. y Fox, P. F. 1988).

La adición de lisina o ácido 6-aminohexanoico (0,1M), produce la disociación de la plasmina y el plasminógeno de la micela, sugiriendo esto que están asociados con la caseína vía residuos de lisina. En sangre el plasminógeno se liga a la fibrina por medio de los sitios de unión con la lisina. Estos sitios también interactúan con el ácido 6-aminohexanoico o con la lisina, lo que disocia el complejo plasminógeno-fibrina. Probablemente es también lo que ocurre entre la unión de la plasmina con la micela de caseína vía interacción con los residuos de lisina (Grufferty, M.B., y Fox, P. F., 1988). El mismo resultado se tiene con NaCl 1M, etanol, o sometiendo la leche durante a pH menores a 4,6. Richardson y colaboradores (1981) aseguraron disociar la plasmina de la micela a pH<5,7,

por otro lado, Grufferty y Fox (1988), informaron que la disociación es completa a $\text{pH} < 4.6$.

La membrana del glóbulo graso tiene un conjunto de proteasas con actividad comparable con las proteasas de la micela caseínica bovina sobre un grupo dado de proteínas básicas, habiéndose comprobado la existencia de más de una proteasa en la membrana del glóbulo graso, siendo la principal la plasmina. De varios inhibidores de proteínas examinados, el diisopropilfluorofosfato (DFP) fue el más efectivo inhibidor de la plasmina aunque ésta no fue completa, lo que sugiere la presencia de más de una proteasa en la membrana del glóbulo graso bovina (Hofmann, C.J., Keenan, T.W., y Eigel, W.N., 1979).

La estabilidad de la plasmina en los sistemas caseínicos no micelares es menor que en la dispersión de la micela caseica, lo que indicaría que la estructura de la micela de algún modo protege de la desnaturalización a la enzima.

El peso molecular de la plasmina determinado por filtración en gel es de 100.000, pero basado en la secuencia de aminoácidos de la plasmina, el peso molecular está entre 81.000 y 83.200 Dalton. Su actividad es máxima a $\text{pH} 7,5$ y a 37°C , Kaminogawa y colaboradores (1972) encontraron que solamente es estable a pH entre 4 y 9 a 20°C .

La estabilidad al calor de la plasmina depende del pH . La plasmina aislada es inactivada totalmente cuando es tratada durante 10 minutos a 80°C y $\text{pH} 7,0$. El contenido de plasmina inmediatamente después de la pasteurización de la leche (72°C y 15 segundos) disminuye un 10-17%, pero posteriormente durante el almacenamiento de la misma, la actividad de la plasmina es un 30-40 % superior probablemente por la destrucción de inhibidores de los activadores del plasminógeno (Grufferty, M.B. y Fox, P. F. 1988, Zalazar, C., y col., 1994).

II. 3. 1. Aislamiento de la plasmina de la leche:

El primer aislamiento de la proteasa alcalina de la leche se llevó a cabo precipitándola de una solución comercial de caseína por adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15-23% (V) y ajustando el pH a 4.6. Esta preparación tuvo una actividad 150 veces mayor que la caseína original. A partir de esta experiencia se van probando, a diferentes concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, otros pH, con posteriores enriquecimientos sobre una o más de los siguientes tipos de cromatografías: DEAE celulosa, CM celulosa, DEAE Sepharosa 6B, CM Sephadex C-50, Sephadex G-100 o G-200, Lisina-Sepharosa 4B; llegando a tener una actividad 17.000 veces mayor a la original (Grufferty, M.B. y Fox, P. F. 1988).

II. 3. 2 . Sistema de la plasmina en la leche:

El sistema consta de cinco componentes principales: plasminógeno, plasmina (enzima que solubiliza el coágulo de fibrina en sangre), activador de plasminógeno, inhibidor de la plasmina e inhibidor del activador del plasminógeno, todos ellos están presentes en la leche (Fig. II.2).

La plasmina, el plasminógeno y los activadores del plasminógeno están asociados con la micela de caseína en la leche, mientras que los inhibidores de la plasmina se encuentran en el suero (Fox, P.F., 1.993).

Usando técnicas inmunoquímicas se verifica que la mayor parte del plasminógeno y la plasmina están íntimamente asociados a la micela de caseína. En la fracción del suero y en la capa de lípidos fueron encontradas bajas cantidades de ambos, pero esto puede ser resultado de plasminógeno y plasmina asociados con pequeñas cantidades de caseína soluble o sub-micelas de caseína presentes en estas fracciones. Tanto la plasmina como el plasminógeno están

ausentes en los extractos de células somáticas (Hayes, K.D., Nielsen, S.S., 2000; Politis, I., Barbano, D.M., Gorewit, R.C., 1992).

Las formas predominantes del plasminógeno identificadas por electroforesis bajo condiciones no reducidas fueron proteínas con pesos moleculares de 88.000, 152.000, y 160.000 Dalton. Las formas identificadas luego bajo condiciones reducidas fueron dos proteínas con un peso molecular aproximado de 88.000 y 50.000. El 82% de estas proteínas estaban asociadas a la fracción de caseína (Politis, I., Barbano, D.M., Gorewit, R.C. 1992).

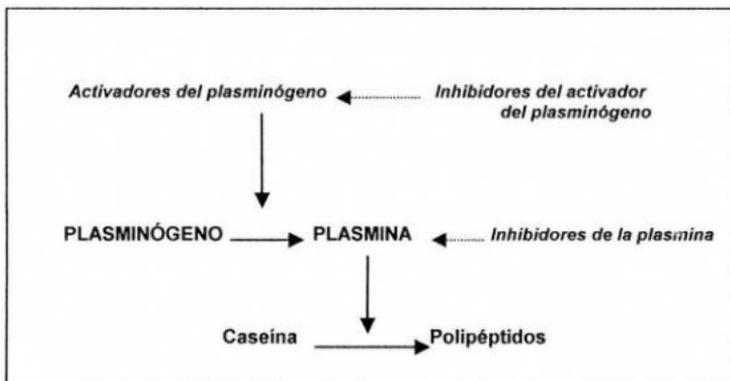


Fig.II.2. Sistema de plasmina de la leche (Modificado por Bastian y Brown, 1996).

II. 3. 3 .Activadores e inhibidores del plasminógeno en leche bovina:

En 1981 Richardson y Pearce demostraron que la concentración de plasminógeno en leche y en las soluciones de caseína disminuye durante el almacenamiento a 37° C durante tres días y paralelamente aumenta la concentración de plasmina. Esto sugiere que el plasminógeno es convertido en plasmina por los activadores presentes en la leche. Los activadores e inhibidores de los activadores del plasminógeno, el plasminógeno y la plasmina presentes en

la sangre, pasan a la leche a través de la glándula mamaria, de allí su presencia en la misma.

En la leche bovina los activadores del plasminógeno están asociados con la micela de caseína, mientras que los inhibidores de la plasmina se encuentran solamente en el suero lácteo. Richardson y Pearce en 1981 midieron el contenido del activador del plasminógeno en la caseína. Para ello se incubó plasminógeno bovino purificado con la caseína obtenida de leche pasteurizada y precipitada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, y se comparó la actividad del activador del plasminógeno con el producido por la uroquinasa. De esta manera se calculó que la actividad del activador del plasminógeno de la leche fue equivalente a 0.5 unidades de uroquinasa por mililitro.

El activador del plasminógeno retuvo su máxima actividad luego del calentamiento durante 10 minutos a 70°C , recién disminuyó su actividad aproximadamente un 50%, luego de calentarlo 1 minuto a 80°C .

Noomen (1975) observó que la actividad de la plasmina en leche es un 30-40% mayor luego de la pasteurización, y sugirió que era debido a la destrucción del inhibidor de la plasmina. Sin embargo, en Richardson (1981) demostró que esto es improbable debido a que la plasmina, el plasminógeno y el inhibidor de la plasmina a 70°C presentan una estabilidad similar, siendo la vida media 35.3, 33.3, 34.3 minutos respectivamente. La activación del plasminógeno en leche durante el almacenamiento es mucho mayor luego de la pasteurización, y este aumento de su actividad proteolítica luego del tratamiento térmico es debido a la destrucción de un inhibidor del activador del plasminógeno antes que el inhibidor de la plasmina (Grufferty, M.B., y Fox, P. F., 1988).

Politis, White, Zavizion, Goldberg, Guo, y Kindstedt, 1994; informaron que todas las caseínas individuales (CN- α , CN- β , CN- κ) incrementan la actividad de