

los activadores del plasminógeno : tipo uroquinasa y tipo tisular. La concentración óptima de CN- α y CN- β es de 5 y 25 $\mu\text{g} / \text{ml}$, respectivamente. El incremento de la actividad enzimática disminuyó cuando las concentraciones de CN- α y CN- β fueron mayores. En el caso de la CN- κ , aumentos de su concentración entre 0 y 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$ resultaron en un correspondiente incremento en la actividad de ambos tipos de activadores de plasminógeno. La CN- α fue la más efectiva en incrementar la actividad de los activadores del plasminógeno. Evidencias indirectas obtenidas con experiencias utilizando CN- α inmovilizada en agarosa sugirieron que el efecto está relacionado a la extensión de unión del plasminógeno y ambos tipos de activadores de plasminógeno a la caseína. Ambos activadores de plasminógeno están presentes en la leche bovina. Heegard y colaboradores (1994) sugieren que el activador del plasminógeno tipo tisular es el principal activador de plasminógeno asociado con la caseína y que el tipo uroquinasa fue asociado con las células somáticas de la leche. Por otro lado, Lu y Nielsen (1993) informaron encontrar cinco fracciones de diferente peso molecular de este último tipo de activador del plasminógeno en la fracción caseínica de la leche.

Existen diferencias importantes entre la leche humana y la de los rumiantes. Por ejemplo la principal caseína de la leche bovina es la CN- αS (CN- αS_1 y la CN- αS_2) pero la leche humana sólo contiene trazas de estas dos caseínas.

Homologías entre los activadores del plasminógeno bovino y humanos fueron del 75%. La extrapolación de los resultados de la leche humana a la leche bovina no está justificada (Politis, I., White, J.H., Zavizion, B., Goldberg, J.J., Guo, M.R. and Kindstedt, P. 1994).

II.3.4. Factores que afectan la actividad de plasmina en la leche :

Independientemente de los procesos tecnológicos a los que puede ser sometida la leche para su consumo como leche fluida o para la elaboración de diversos productos lácteos que pueden afectar la actividad de la plasmina, existen otros factores "naturales" a los cuales se atribuyen la diferencia de actividad de la enzima entre las diferentes materias primas. Así la actividad de la plasmina varía durante la etapa de la lactancia, la raza de la vaca, la edad de la vaca, o la mastitis. (Grufferty, M.B., Fox, P.F., 1988).

a) Según el período de la lactancia – lactancia reciente : 2 ó 3 meses de inicio de la lactancia, lactancia tardía : 7 ó 8 meses de lactancia - el contenido de actividad varía. En la lactancia tardía, el contenido de las caseínas- α S y β (ambas sustratos de la plasmina) disminuye mientras que el nivel de caseína- γ se incrementa, atribuyéndose estos cambios a la alta concentración de plasmina en la leche de lactancia tardía (Davies, Law, 1977; Barry, Donnelly, 1980). Korycka-Dahl y colaboradores (1983) informaron que la concentración de plasmina en la leche de lactancia tardía no es significativamente diferente de la leche de lactancia media, pero la concentración del plasminógeno es dos veces mayor en la primera (Koryka-Dahl, M., Ribadeau Dumas, B., Chene, N., Martal, J., 1983). Otros investigadores verificaron que también varía la actividad del activador del plasminógeno entre el comienzo y el final de la lactancia, teniendo éste un aumento considerable entre el primer y séptimo mes del período de lactancia (Baldi, A., Savoini, G., Cheli, F., Fantuz, F., Senatore, E., Bertocchi, L., Politis, I., 1.996).

b) Raza de la vaca : el contenido de caseína- γ de leches Holandesas (zona de Friesian) (Barry y Donnelly, 1980,) es más de dos veces mayor que la leche de Ayrshire (Davies y Law,1977), lo que puede indicar un mayor contenido

de plasmina en las primeras. Richardson y colaboradores (1981) informaron que la plasmina contenida en la leche de Jersey es inferior que en la leche de Friesian, con más altos niveles en leches de vacas cruzadas (o mestizas) Sueco Holandesas - Suecas rojas y blancas. La leche de estas razas puras : la Sueco-Holandesa, la Sueca Roja y la Sueca Blanca tuvieron valores intermedios.

c) Edad de la vaca : el incremento del contenido de plasmina en la leche es afectado por la edad de la vaca. El incremento de la caseína- γ y la disminución de la caseína- β , que ocurre en la leche durante la lactancia tardía fue especialmente marcada en leche de vacas más viejas (Davies y Law, 1977). También la actividad de la plasmina en la leche parece incrementarse , con el incremento del número de lactancias (Schaar, 1985). Este incremento se asigna a un aumento en la permeabilidad de la glándula mamaria lo que permite un mayor traspaso de la enzima desde la sangre a la leche .

d) Mastitis : el nivel de plasmina en leche se incrementa durante la infección mastítica. Este aumento se atribuye a un incremento de la permeabilidad de la glándula mamaria por el proceso inflamatorio y a la secreción de activadores del plasminógeno por los leucocitos (proteasas de las células somáticas). Esto puede ocurrir también en la lactancia tardía. Schaar y Funke (1986) informaron que la plasmina y el plasminógeno contenido en la leche incrementa un 82 y 21% respectivamente durante la mastitis sub-clínica. La mastitis también conduce a la transferencia parcial de ambos desde la micela de caseína al suero de la leche.

II.4 PROTEÓLISIS DE LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE POR LA PLASMINA:

II. 4. 1 Caseína- κ :

La plasmina tiene muy baja actividad sobre la caseína- κ , la especificidad de su acción sobre esta caseína no ha sido bien determinada (Fox, P.F. and Mc Sweeney, P.L.H 1996).

Eigel (1977) informó que la caseína - κ era resistente a la proteólisis por la plasmina luego de incubar durante 60 minutos la caseína- κ con plasmina sanguínea en un buffer de tetraborato de Na 0.05 M, pH 8.4. Sin embargo, la caseína- κ en un buffer de fosfato de sodio 0.05M, pH 7.0, fue hidrolizada por la plasmina en un minuto a 37° C (Andrews y Alichanidis, 1983). Estas diferencias pueden deberse simplemente a las condiciones experimentales y / o a la concentración de enzima y sustrato usada.

II.4. 2. Caseína - α_{s2} :

La plasmina hidroliza la caseína - α_{s2} (1-2% en Tris-CIH 0.01 M, pH 7.8, conteniendo CaCl_2 0.002M) para dar varios péptidos aniónicos con alta movilidad electroforética a pH 9.0 y algunas bandas catiónicas difusas (Snoeren y van Riel, 1979). Estos resultados fueron confirmados por Andrews y Alichanidis, 1983 (Grufferty, M.B. y Fox, P. F. 1993).

En la caseína - α_{s2} , 8 uniones peptídicas son sensibles a la plasmina, 7 son del tipo Lys-X : Lys-Gln (f21-22), Lys-Asn (f24-25), Lys-Lys (f149-150), Lys-Thr (f150-151), Lys-Thr (f181-182), Lys-Ala (f188-189), Lys-Thr (f197-198) y sólo una Arg-X, la Arg-Asn (f114-115) teniendo una significativa preferencia por las uniones Lys-X ; y la mayoría de los péptidos liberados son solubles a pH 4.6. Los cortes producen 14 péptidos, tres de los cuales son potencialmente amargos (

menor que la caseína α_{s1} y varios péptidos con movilidad más rápida. Dos de los que tenían mayor movilidad contenían fósforo en su molécula.

Aimutis y Eigel (1982) encontraron que el patrón electroforético del hidrolizado de la caseína- α_{s1} producido por la plasmina era idéntico a la fracción de caseína- λ presente en la leche. Se puede concluir que la caseína- λ que aparece en la leche resulta probablemente de la proteólisis de la plasmina sobre la caseína α_{s1} (Grufferty, M.B. y Fox, P. F. 1988a).

D. Le Bars y J.C.Gripon en 1989 y McSweeney y colaboradores (1993c), estudiaron la hidrólisis de la caseína α_{s1} por la plasmina bovina. Encontraron que los principales sitios de corte son: Arg-Phe (f22-23), Arg-Tyr (f90-91), Lys-Lys (f102-103), Lys-Tyr (f103-104), Lys- Val (f105-106), Lys-Glu(f124-125) y Arg-Gln (f151-152)(Fig.II.4). La mayoría de los péptidos que se forman provienen de la parte amino terminal o central de la caseína α_{s1} , produciéndose el corte en las uniones Lys-X ó Arg-X, teniendo preferencia sobre las uniones Lys-X . No observaron cortes en la región hidrofílica 41-80 que contiene 7 residuos fosfoserina. Identificaron 15 fragmentos y éstos resultaron del corte en 11 de las 20 bandas peptídicas que potencialmente pueden ser cortadas por la plasmina en la caseína α_{s1} . La cantidad relativa de los productos de degradación en relación a las caseínas- γ , confirma que la caseína- α_{s1} es mucho menos susceptible a la hidrólisis por la plasmina que la caseína- β (Le Bars, D., Gripon, J.C. 1989).

II. 4. 4. Caseína – β :

La caseína- β es hidrolizada por la plasmina a caseínas- γ (Kaminogawa y Yamauchi, 1972a; Eigel, 1977; Snoeren y van Riel, 1979) y la parte complementaria a estos restos son fracciones proteasa peptona (PP) conocidas

29), Lys-His (105-106), Lys – Gln (107-108) produciendo , CN- γ_1 (f29-209), CN- γ_2 (f106-209), CN- γ_3 (f108-209), fracción soluble PP8- rápida (f1-28), PP5 (f1-105 y f1-107) y PP8-lenta (f29-105 y f29-107) (Eigel y colaboradores., 1984) (Fig.II.5). Otros lugares de corte se dan en los sitios Lys-Tyr (f113-114) y Arg-Asp (f183-184) (Fox y colaboradores., 1994; Fox, P.F. and Mc Sweeney, P.L.H 1996) (Fig.II.6).

Andrews (1978a) aisló la PP 5 y PP 8-rápida de la leche y sobre la base del peso molecular, la composición de aminoácidos y los aminoácidos amino y carboxilo terminal, sugirió que PP5 es una mezcla de dos péptidos correspondientes a la secuencia 1-105 y 1-107 de caseína- β y que la PP 8-rápida representa residuos 1-28 de la caseína- β . Eigel y Keenan (1979) sugirió que la PP 8 – lenta es el residuo 29-105 de la caseína- β .

La fracción de proteasas peptonas (PP) de la leche tiene un mínimo de 38 componentes, 25 de los cuales pueden ser atribuidos a la proteólisis de la caseína por la plasmina. De éstos el 52% provienen de la caseína- β , el 29% de la caseína- α_{s1} , el 9% de la caseína- α_{s2} y el 4% de la caseína- κ . El 6% remanente es atribuible a la acción de otras proteasas naturales.

La caseína- β es hidrolizada por la plasmina más rápidamente que la caseína - α_{s1} . La caseína- β es hidrolizada totalmente por la plasmina en 4 minutos a 37° C, mientras que la caseína- α_{s1} en 30 minutos. La caseína- β y la caseína- α_{s2} son hidrolizadas a una velocidad similar, lo que demuestra que éstos son los sustratos preferidos de la plasmina.

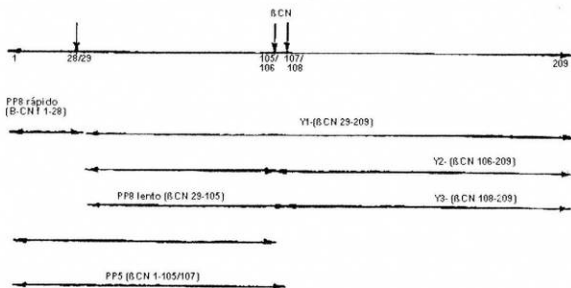


Fig. II.5. Principales productos obtenidos de la acción de la plasmina sobre la beta caseína.

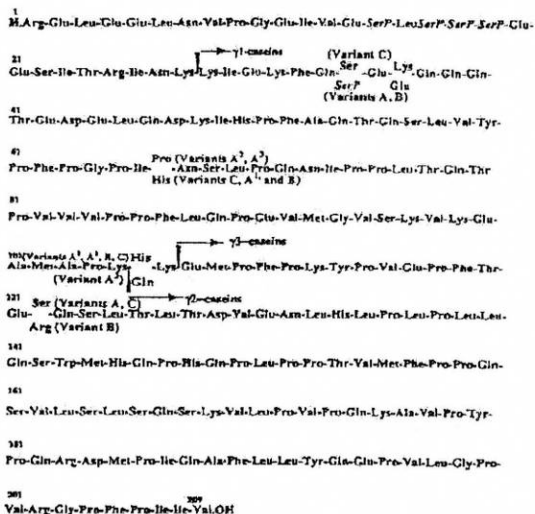


Fig. II.6. Secuencia de aminoácidos de la caseína - β, mostrando la sustitución de aminoácidos en las variantes genéticas y los principales sitios de corte de la plasmina (▼) (Swaigood, 1992).

II. 4. 5. Acción sobre otras proteínas:

La β - lactoglobulina (β - Ig) y la α - lactalbúmina (α -la), proteínas del suero, son resistentes a la hidrólisis por la plasmina (Kaminogawa y Yamauchi, 1972a). En realidad ellos informaron que la β - Ig inhibe la proteólisis de la caseína por la plasmina. Posteriormente, Snoeren (1979) y Grufferty y Fox (1988) demostraron que primero se debe producir la desnaturalización por calor de la β - Ig y luego tiene lugar su efecto inhibitorio, de manera tal que la interacción entre la plasmina y la β - Ig es dependiente del calor. (Grufferty, M.B. y Fox, P. F. 1988; Fox, P.F. 1.993; Bastian, E., Hansen, K., Brown, R 1993).

II. 5. ESTABILIDAD AL CALOR DE LA PLASMINA:

La plasmina aislada fue completamente inactivada al someterla durante 10 minutos, a 80° C a pH 7.0 (Kaminogawa y colaboradores. 1972a).

La pasteurización de la leche a 72° C durante 15 segundos disminuye el contenido de plasmina entre el 10% (Korycka-Dahl y colaboradores., 1983) y el 17% (Richardson, 1981). En realidad la pasteurización incrementa la actividad de la plasmina durante el sub-siguiente almacenamiento de la leche (Noomen, 1975; de Rham y Andrews, 1982; Andrews, 1983; Korycka-Dahl y colaboradores. 1983; Richardson, 1981; Andrews y Alichanidis, 1983) probablemente debido a la destrucción de los inhibidores de los activadores del plasminógeno (Grufferty y Fox. 1988a).

El tratamiento térmico necesario para prevenir la proteólisis durante su almacenamiento en leches esterilizadas por UHT o en botellas, fue de 142° C durante 18 segundos o 120° C durante 15 minutos respectivamente. (Driessen y van der Waals, 1978; Fox,P.F.,1.993).

Diversos autores (Grufferty, M., Fox, P., 1988; Rollema, H.S., Poll, J.K., 1986; Alichanidis y col., 1986) encontraron que la estabilidad al calor de la plasmina en la leche pasteurizada fue mas baja que en una dispersión micelar de caseína sometida al mismo tratamiento térmico.

La estabilidad al calor de la plasmina es menor en sistemas caseínicos no micelares que en una dispersión micelar de caseína, indicando esto que la estructura micelar de algún modo protege la enzima contra la desnaturalización. La estabilidad al calor de la plasmina aislada se incrementó por la presencia de 0.1 ml lisina/l, sugiriendo que las uniones de la plasmina sobre las micelas de caseína vía residuos de lisina pueden aumentar su estabilidad al calor (Grufferty, M.B., y Fox, P. F. 1988) .

Los mismos autores comprobaron que el sistema enzimático de la plasmina:plasminógeno en una dispersión micelar de caseína es altamente resistente al tratamiento térmico (90° C, 15 minutos), mientras que si a esta solución caseínica se le agrega una solución de β - lactoglobulina la resistencia térmica del complejo enzimático se reduce notablemente.

H.S Rollema y J.K.Poll, realizaron en 1986 un estudio de los mecanismos cinéticos de inactivación por calor del sistema de proteasa alcalina de la leche, cuando es sometido durante 15 minutos a 60° C; determinando que la velocidad de inactivación por calor tanto de la plasmina como del plasminógeno responde a una expresión de primer orden de reacción y la constante de velocidad de inactivación se encontró proporcional a la concentración de β - lactoglobulina.

Los procesos de inactivación térmica de la plasmina y plasminógeno están ampliamente gobernados por la interacción específica entre la forma desnaturalizada de la β - lactoglobulina, la plasmina y el plasminógeno. Se produce una interacción reversible entre los grupos -SH de la β - lactoglobulina

desnaturalizada por el calor y los grupos -S-S- de la plasmina y del plasminógeno, observándose que le confiere al sistema enzimático menor resistencia o estabilidad al calor (Grufferty, M.B., Fox, P.F., 1988).

Es importante desde el punto de vista tecnológico tener en cuenta que en ausencia de β - lactoglobulina, la plasmina y el plasminógeno son mucho más resistentes al tratamiento térmico, ya que cuando se debe elaborar un producto lácteo libre de las proteínas del suero y se necesita inactivar la enzima y su precursor, se requerirán tratamientos térmicos mucho más severos.

A su vez, como efecto contrapuesto a éste, el calor produce la inactivación por desnaturalización de los inhibidores de los activadores del plasminógeno, por lo que se produce un efecto positivo en la activación del plasminógeno a plasmina. En términos generales se observó que lo que predomina luego de la pasteurización de la leche es este último efecto, por lo que en definitiva, el resultado final es un aumento de la actividad enzimática de la plasmina.

II. 6 . EFECTOS DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LA PLASMINA SOBRE LAS PROPIEDADES DE LA LECHE Y LOS PRODUCTOS LÁCTEOS:

Hasta hace poco tiempo, la actividad de la plasmina en la leche se consideraba que no era importante desde el punto de vista tecnológico. Sin embargo el desarrollo de relativamente nuevas técnicas en la manufactura de lácteos (largos tiempos de almacenamiento en frío, productos esterilizados por ultra-alta - temperatura, (UHT), entre otros) ha determinado que la acción de esta enzima vaya adquiriendo importancia en cuanto a su incidencia en las características del producto logrado.

De este modo se han estudiado una serie de cambios fisicoquímicos que ocurren en la leche, el queso y las soluciones de caseína como resultado de la acción de la plasmina (Fox, P.F., 1.993).

II. 6. 1. Viscosidad:

Diessen y colaboradores (1978) informaron una disminución de la viscosidad de la leche UHT durante el almacenamiento a 20° C, y demostraron por electroforesis en gel que coincide con la proteólisis de la caseína por la plasmina. Se verificó en 1981 (Richardson, B.C., Pearce, K.N.) una relación entre la viscosidad de una solución de caseinato y la actividad de la plasmina, observándose que es elevada la viscosidad cuando la actividad de la plasmina es muy pequeña, mientras que la viscosidad es baja a elevados niveles de plasmina. También la leche de la lactancia tardía tiene una viscosidad reducida presumiblemente debido a la elevada actividad de plasmina en este período.

II. 6. 2 Contenido en nitrógeno soluble:

Ya en 1945 se informó que el incremento en el nitrógeno soluble a pH 4.6 durante el almacenamiento de soluciones de caseína era debido a la proteólisis producida por una enzima asociada a la caseína. Noomen en 1975, verificó un incremento de un 6 a un 10% del nitrógeno soluble luego de incubar la leche a 37° C durante 3 días, presumiblemente producida a la proteólisis efectuada por la plasmina. Este incremento del nitrógeno soluble resultó mayor cuando la leche era pasteurizada previamente a la incubación. Cuando una dispersión de caseína micelar fue hidrolizada por la plasmina, la cantidad de proteínas solubles a pH 4.6 se incrementó debido a la formación de péptidos. Andrews y Alichanidis (1983) informan que el 94% del total de fracciones de proteasas peptonas en la leche

puede ser atribuido a la hidrólisis de la caseína por la plasmina, y como esta fracción es soluble a pH 4.6, el incremento de nitrógeno soluble al mismo pH es probablemente debido a este hecho.

II.6.3. Estabilidad al etanol:

La proteólisis de una dispersión micelar de caseína por la plasmina no afecta su estabilidad al etanol (Grufferty y Fox, 1988). La baja estabilidad al etanol de la leche de lactancia tardía, es probablemente debida, principalmente, a una alta concentración de calcio más que a una elevada actividad de plasmina (Fox, P.F., 1.993).

II. 6. 4. Estabilidad al calor de la leche:

Las variaciones de la estabilidad al calor se deben más a cambios estacionales que a cambios en la composición de la leche según el período de lactancia. Se comprobó en un estudio durante un año en una cremería Irlandesa que la máxima estabilidad al calor se producía durante los meses de abril-octubre y una mínima estabilidad durante los meses de noviembre- marzo. Esta considerable variación estacional en la estabilidad al calor de la leche (Fox, 1984) parece ser debida principalmente a los cambios en las concentraciones de la urea y el calcio soluble, teniendo la actividad de la plasmina una muy pequeña contribución. Politis y colaboradores (1.989) comprobaron que no existe una variación significativa en el contenido de plasmina en la leche de distintos períodos estacionales.

II. 6. 5. Cambios en la elaboración de quesos:

La elaboración de quesos con leche deteriorada por el avance de la lactancia da como resultado un queso con un elevado contenido de humedad y características de cuerpo y reológicas alteradas. El alargamiento y la capacidad de fundirse del queso Mozzarella hecho con leche de lactancia tardía es inferior al de aquellos hechos con leche en el período medio de la lactancia.

Diversos cambios se presentan en la leche con el avance de la lactancia (incremento del pH, concentración alterada de calcio, estructura micelar modificada) lo que podría contribuir a los cambios de las características del queso, pero muchos investigadores consideran que el incremento de la actividad de la plasmina tanto en la lactancia tardía como en la mastitis es la razón principal. La leche de la lactancia tardía con una pobre propiedad de formación de cuajada tiene altos contenidos de CN- γ y de otros fragmentos de caseína, y bajos niveles de caseínas α_{s1} , β y κ en relación a las leches con buenas propiedades de formación de cuajada.

El tiempo de coagulación enzimático de la leche, la firmeza, y la sinéresis del gel resultante se deteriora con el avance de la lactancia; el queso producido tiene un alto contenido de humedad, pobre cuerpo y textura, y pobres propiedades de fusión y extensibilidad. Se ha sugerido que estos cambios pueden deberse a la proteólisis que realiza la plasmina, sin embargo el tiempo de coagulación y las propiedades del gel formado son significativamente afectados sólo después de una extensiva proteólisis por la plasmina. Por otro lado el mayor contenido de humedad se atribuyó asociación del agua con algún péptido producto de la acción de la plasmina sobre las caseínas, quedando de esa forma atrapada en la cuajada (Grufferty, Fox, 1988).

Donnelly y colaboradores (1984) informaron que el contenido de humedad del queso Cheddar estaba directamente relacionado con la extensión de la pre-hidrólisis de la leche por la tripsina (la que tiene una especificidad similar a la plasmina) y concluyeron que la proteólisis de la caseína por la plasmina natural contribuye significativamente a los elevados niveles de humedad en quesos hechos a partir de leche de lactancia tardía. Sin embargo, de acuerdo a Pearse y colaboradores (1986), ocurre una sinéresis normal en un queso elaborado con una leche en la que aproximadamente el 50% de la CN- β de la misma, ha sido hidrolizada por la plasmina.

Por otro lado, la coagulabilidad enzimática de la leche de lactancia tardía puede ser mejorada por acidificación y/o adición de CaCl_2 , sugiriendo esto que la elevada actividad de la plasmina no es el único factor responsable de los cambios de las características de la formación de la cuajada, sino que también pueden ser producidos por otros cambios de composición, por ejemplo, la concentración de minerales y el aumento del pH que tienen un efecto importante (Fox, Stepaniak, 1993; Pearse, y col., 1986).

II. 6. 6 Maduración de quesos:

La velocidad, extensión y naturaleza de la proteólisis durante la maduración, así como la cantidad y naturaleza de los productos de la proteólisis varía según la actividad de las enzimas involucradas, y esto depende de una serie de factores: características de la leche utilizada en la elaboración del queso (especie, raza, período de lactancia, calidad bacteriológica, etc.), y de las condiciones y características de elaboración y maduración del queso (temperatura de cocción, tiempo de maduración, pH del queso, starters utilizados, de las

condiciones ambientales de la maduración, concentración de NaCl, etc.) (Grappin, R., Rank, T.C., Olson, N.F., 1.985) .

En relación a las condiciones de elaboración del queso, por ejemplo, Noomen en 1.975 demostró en una simulación con un queso tipo Meshanger que la proteólisis producida por la plasmina era dependiente del pH, la concentración de NaCl y la temperatura de maduración. A un pH entre 5.4 y 4.0 a 13° C, la caseína- α_{s1} fue hidrolizada más rápidamente que la caseína- β con formación de un péptido con una movilidad electroforética similar a la caseína- α_{s1-i} , indicando la acción de la proteasa ácida natural de la leche. Entre pH 5.6 y 6.2 la proteólisis por la plasmina fue evidente durante la maduración, hidrolizándose más rápidamente la caseína- β que la caseína- α_{s1} acompañada de la formación de caseína γ , y cuanto mayor era el pH, mayor fue la proteólisis. Encontraron que la actividad de ambas enzimas naturales era estimulada por NaCl al 2-4%, pero disminuía si se aumentaba la concentración del NaCl. Aumentando la temperatura entre 4 y 37°C, la proteólisis de estas enzimas fue mayor. Finalmente constataron que la acción de la plasmina sobre el queso tipo Meshanger es pequeña debido a su pH bajo (~5.6), su alta concentración de NaCl (~6%) y su corto período de almacenamiento (Fox,P.F.,1.993).

El significado de la acción de la plasmina en los cambios de las características del queso está siendo estudiado, encontrándose en la bibliografía, por ahora, algunos resultados contradictorios en cuanto a su acción, debiéndose continuar su estudio.

En el punto anterior se presentó en términos generales, la discusión que se da entre diversos autores acerca de la influencia que tienen los distintos contenidos de plasmina presentes en la leche sobre la calidad de la cuajada formada y su posterior incidencia en el cuerpo y la textura del queso .

Su participación durante la etapa de maduración del queso, depende de las condiciones antes detalladas. En condiciones adecuadas participa junto a la quimosina en la primer etapa de la maduración produciendo la hidrólisis de las caseínas a péptidos largos o intermedios sobre los que posteriormente actúan las proteinasas y peptidasas del starter y no-starter. Su acción hidrolítica sobre las distintas caseínas ya fue desarrollada específicamente en el punto II.4. del presente capítulo.

Por otro lado, el rol de la plasmina en el desarrollo del flavour durante el proceso de maduración de los quesos permanece incierto. Debido a su acción durante la maduración del queso, produciendo la proteólisis de las caseínas, se originan productos precursores de pequeños péptidos o aminoácidos libres que son importantes en reacciones catabólicas que desarrollan compuestos que otorgan diferentes características sensoriales, agradables o no, al queso.

Así, la enzima ha sido implicada en el mal flavour (astringente) de la leche y en el sabor amargo del queso (Le Bars, Grippon, 1989). Esta astringencia y sabor amargo se atribuye a los péptidos hidrofóbicos provenientes de su acción sobre las caseínas α_{s2} y β . Otros autores (Lawrence y colaboradores 1983; Ollikainen y Nyberg 1988) encontraron que la plasmina juega un rol beneficioso por ejemplo, en la maduración del queso tipo Emmental. También Farkye, N.Y. y Landkammer, C. (1992), comprobaron en una experiencia modelo que la intensidad del flavour fue mayor en un queso Cheddar adicionado con tres y seis veces más de plasmina respecto al control. No constataron diferencias en el cuerpo de los quesos con diferente contenido de plasmina, siendo los que tenían tres veces más de enzima los que tuvieron o el más alto o el segundo puntaje en cuanto a la calidad total al ser sometidos a un panel de evaluación sensorial.

Otra experiencia interesante fue aportada por E.D. Bastian, C.G.Lo y K.M.M.David en 1997, quienes elaboraron queso Suizo con leche adicionada con distintas concentraciones de uroquinasa (activador del plasminógeno) con el objetivo de incrementar la actividad de la plasmina y la hidrólisis de las caseínas en este queso y evaluar el resultado del flavour desarrollado. Pudieron observar que la adición de uroquinasa a la leche con que se elaboró el queso Suizo, resultó en un incremento de la actividad de plasmina, en un incremento de la hidrólisis de la caseína- β durante las primeras doce semanas de maduración, y en un incremento en la percepción de ácido propiónico y de la intensidad del flavour en general luego de las doce semanas comparado con el queso control. Luego de 24 semanas de maduración, las diferencias con las características sensoriales notadas a las 12 semanas no fueron mayores .

Estas experiencias coinciden en plantear que la adición de plasmina en el proceso de elaboración de los quesos, acelera la maduración y la proteólisis. La plasmina se constituye en un aditivo ideal para estos fines ya que es una enzima natural, por ello su suplementación a la leche para elaborar quesos no presentaría problemas legales, es específica y causa una proteólisis bastante limitada y puede ser completamente incorporada y uniformemente distribuida en la cuajada del queso (ésta es la principal limitación con otras proteinasas).La desventaja en la utilización de esta enzima es su costo; quizás producida a nivel industrial, podría reducirse el mismo. El gen que codifica el plasminógeno podría ser clonado en bacterias del starter u otras bacterias convenientes, la clonación ya fue lograda con el plasminógeno humano. Alternativamente se podría considerar, la activación del plasminógeno natural, por ejemplo, con la adición de uroquinasa a la leche con que se elabora el queso, para ello son necesarias sólo cantidades catalíticas del activador del plasminógeno, lo que puede ser una ventaja respecto

a la adición directa de plasmina (Farkye, N., Landkammer, C., 1992; Fox, P.F., Stepaniak, L., 1993; Bastian, E. D., Lo, C.G., David, K.M.M., 1997).

II. 6. 7. Gelificación de las leches UHT:

El mecanismo de gelificación de las leches UHT aún no ha sido resuelto. Podría ser causado por la proteólisis de la caseína durante su almacenamiento, producido por proteasas de bacterias resistentes al calor o por la plasmina.

Snoeren y colaboradores. (1979) aisló la plasmina de la leche UHT por cromatografía de afinidad. También demostraron que la proteólisis ocurrió en la leche UHT durante el almacenamiento y que la CN- β es hidrolizada más rápidamente que la CN- α_{s1} con la formación de CN-Y, sugiriendo la actividad de la plasmina.

Cuando se adicionaron inhibidores de la plasmina a la leche UHT no se produjo proteólisis o gelificación hasta 9 meses después del almacenamiento a 20° C, y en la leche control ocurrió la gelificación aproximadamente a los 60 días (Koning y colaboradores. , 1985). Sin embargo en la leche UHT concentrada en la cual la plasmina y el plasminógeno no fueron detectados, la gelificación ocurrió a los 41 días a 30° C. Ellos concluyeron que en la leche esterilizada UHT no concentrada, la gelificación es debida a la proteólisis, pero que la leche UHT concentrada gelifica no por una vía enzimática, sino por un mecanismo fisicoquímico.

Son útiles los tratamientos de esterilización de la leche ya que reducen la reacción de pardeamiento y destruyen totalmente las bacterias, pero tienen una muy pequeña o ninguna acción sobre la inactivación de las enzimas. La inactivación de las enzimas proteolíticas es de interés práctico debido a que influyen en la estabilidad de los productos esterilizados por procesos UHT, ya que

actúan durante su almacenamiento. Al incrementar la temperatura de esterilización se limita la proteólisis de la leche. Se comprobó experimentalmente, exponiendo la leche a 142° C a diferentes tiempos 2, 4, 8 y 16 segundos y determinando la formación de "caseínas menores" en leche cruda aséptica, que 16 segundos a 142° C es suficiente para el tratamiento directo a UHT, limitando considerablemente en estas condiciones la actividad proteolítica de las enzimas (Grufferty, M.B., Fox, P.F., 1.988).

Capítulo III

OBJETIVOS DE LA TESIS

III . OBJETIVOS DE LA TESIS:

Dentro del marco de los conocimientos planteados precedentemente, se inserta el presente trabajo de tesis, para el cual se han fijado los objetivos que se detallan seguidamente.

III. 1. OBJETIVO GENERAL:

Aportar información que contribuya a aumentar el conocimiento del proceso de maduración de quesos típicos argentinos.

III. 2 OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Realizar una revisión de los diferentes métodos utilizados por distintos grupos de investigación en diversos países, para la determinación de la actividad de plasmina y plasminógeno en productos lácteos.

2. Realizar el análisis de dichos métodos a fin de seleccionar el más apropiado para su implementación, adaptándolo y poniéndolo a punto para las condiciones de trabajo requeridas.

3. Realizar con esta metodología el dosaje de la actividad de plasmina y plasminógeno en diferentes tipos de quesos argentinos del comercio y de elaboración propia.

4. Correlacionar los niveles de plasmina encontrados con el pH del queso, sus condiciones de elaboración y otros parámetros de maduración.

5. Aportar información que contribuya a dilucidar el rol de la enzima en el proceso de la elaboración y en particular de la maduración de los quesos.

Capítulo IV

MATERIALES Y MÉTODOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. 1 REVISIÓN DE LAS METODOLOGÍAS PROPUESTAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PLASMINA EN PRODUCTOS LÁCTEOS:

A continuación se realiza una enumeración de los distintos métodos propuestos para la determinación de plasmina en productos lácteos, con una breve descripción del fundamento de cada uno. Esta revisión será de importancia para la posterior elección del método a usar en este trabajo.

Cabe señalar que no existe un método de referencia para la determinación de plasmina y plasminógeno en productos lácteos.

IV.1.1. Método fluorométrico:

Richardson y Pearce (1981), propusieron una técnica fluorométrica para la determinación de plasmina y plasminógeno en productos lácteos. Mediante la misma se midió la actividad de plasmina haciendo actuar la enzima sobre un sustrato no fluorescente: N-succinil-L-alanil- L-fenilalanil-L-Lisin-7amido-4metil-cumarina, (péptido cumarínico, SIGMA). Como producto de la hidrólisis obtuvieron un compuesto fluorescente: 7amido-4metil-cumarina (AMC). El producto de la hidrólisis producida por la plasmina absorbe energía electromagnética excitándose para volver luego a un nivel de energía ligeramente superior o igual al de su nivel inicial. Parte de la energía es liberada y medida por un fluorómetro.

La actividad de plasmina en quesos se calculó por medio de una curva estándar con concentraciones conocidas de AMC o plasmina. Una unidad de plasmina correspondió a 1 nanomol AMC/min a las condiciones de la experiencia.

Este método también fue utilizado por Farkye y Fox en 1990, para la cuantificación de la enzima en quesos blandos y duros.

La fluorometría tiene la ventaja de ser muy sensible, pero tiene la desventaja de la baja especificidad.

Los métodos fluorométricos tienen, por otra parte, la desventaja de las interferencias provocadas por la extinción y por la presencia de otros materiales fluorescentes no definidos en los reactivos, además de su extrema sensibilidad a las variaciones de pH y de temperatura. En este sentido se debe tener especial cuidado con la limpieza del material de vidrio para eliminar al máximo la fluorescencia de fondo debida a detergentes utilizados y otras sustancias químicas. Por otro lado, se observa extinción consistente en que frecuentemente se transfiere energía de una molécula a otra en solución y se disipa de esta manera en lugar de emitirse directamente como energía de fluorescencia. También suele producirse extinción cuando los materiales extraños forman complejos no fluorescentes con la sustancia de interés.

IV. 1. 2 Enzimoimmunoanálisis (Inmunoabsorbentes ligados a enzimas - ELISA):

Algunos autores (Collin, J.C., Compagnone, P., Ryba, I., Baer, A., 1988; Politis, I., 1993; Dupont, D., Grappin, R., 1998; Stepaniak, L., Jedrychowski, L., Grabska, J., Wróblewska, B., Sørhaug, T., 1998;) utilizaron la técnica de enzimoimmunoanálisis (ELISA) para la determinación de plasmina y plasminógeno. El primer ensayo lo realizó Collin y colaboradores en 1988, quienes determinaron por este método el plasminógeno y la plasmina en la leche, en la cuajada y en el suero de los quesos St. Paulin y Comté.

En la experiencia de Dupont y colaboradores (1998) se utilizó la técnica ELISA sándwich con anticuerpos monoclonales para determinar la enzima en la leche durante los distintos períodos de lactancia (al inicio, en mitad, y al final).

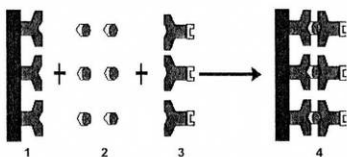
Estos anticuerpos monoclonales con especificidad anti-plasminógeno y anti-plasmina+plasminógeno, se encontraban fijados a una superficie sólida pudiendo ser ésta una membrana, esferas plásticas, pocillos de una placa, una tira plástica o un tubo plástico. Sobre éstos se puso en contacto la muestra (leche o estándar) conteniendo el plasminógeno y/o la plasmina a cuantificar (antígeno), y al cabo de una hora de incubación a 37° C se procedió a lavar la superficie, incubándose nuevamente durante el mismo tiempo y a igual temperatura con el segundo anticuerpo, que en este caso se encontraba conjugado a una enzima (IgG-fosfatasa)(Fig.IV.1). Luego de la incubación se volvió a lavar para eliminar el exceso de conjugado, se adicionó p-nitrofenilfosfato sustrato de la enzima, dando luego de la incubación y lavado un producto coloreado cuya absorbancia se midió a los 10 minutos a 405 nm.(Fig.IV.2). Otros trabajos utilizaron como segunda enzima conjugada la IgG-peroxidasa, y su sustrato: peróxido de hidrógeno, esta reacción liberó oxígeno que oxidó un cromógeno (2'2'-azo-dietilbenzothiazolina – Sigma) dando así un producto coloreado. En este último caso el método tuvo una sensibilidad de 1 ng./ml, y la absorbancia fue lineal hasta una concentración de plasminógeno por encima de 10 ng./ml. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron menores al 10%. En la experiencia de Dupont, utilizaron por un lado la reacción con anticuerpos contra plasminógeno y por otro una reacción contra plasminógeno más plasmina, obteniendo así, por diferencia, la concentración de plasmina.

Una curva construida con diversas diluciones de enzima patrón, permitió cuantificar la muestra.

Los diferentes métodos por ELISA variaron la enzima con la que se marca el segundo anticuerpo, y en consecuencia los sustratos y los cromógenos; pero se basaron en el mismo principio.

Stepaniak junto a colaboradores; obtuvieron resultados lineales para concentraciones de plasminógeno de 20 a 200 ng/ml. Fueron marcadamente más altos los resultados obtenidos por ELISA que aquellos determinados por un método enzimático con un sustrato fluorogénico.

Cabe destacar que por ELISA se puede medir directamente la plasmina enzimáticamente inactiva (plasminógeno) unida a un inhibidor o a la caseína, situación que no es posible por otros métodos descriptos. Es por ello que este método presenta una dificultad técnica no menor: si bien es altamente sensible acarrea el inconveniente de determinar concentración de enzima y no actividad enzimática como ocurre en los métodos fluorométrico o colorimétrico.



- 1- anticuerpos antiplasmina y antiplasminógeno
- 2- muestra (antígeno = plasmina y plasminógeno)
- 3- anticuerpos antiplasmina y antiplasminógeno conjugado (fosfatasa)
- 4- sándwich completo

Fig. IV.1. Método ELISA para la determinación de plasmina y plasminógeno en leche. Primer etapa.

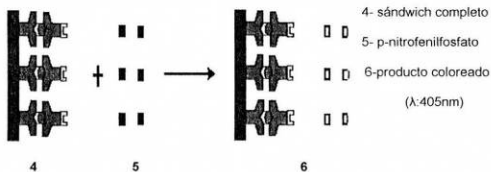


Fig. IV.2. Método ELISA para la determinación de plasmina y plasminógeno en leche. Segunda etapa.

IV. 1. 3. Método colorimétrico:

Existe un elevado número de trabajos basados en ensayos colorimétricos para la determinación directa de plasmina e indirecta de plasminógeno en los productos lácteos. Dichos ensayos están dados por la acción enzimática de la plasmina sobre uno de los aminoácidos (lisina) de un tripéptido cromogénico, liberando del mismo para-nitroanilina la que se determina espectrofotométricamente. El cambio de color está directamente relacionado con la actividad de plasmina y de plasminógeno. Para determinar el plasminógeno es necesario activarlo a plasmina previamente, siendo lo más usado para ello la uroquinasa. Se determina así la plasmina total, es decir la enzima que se encuentra como tal, más la que proviene del plasminógeno y posteriormente, por diferencia con la plasmina cuantificada en forma directa, se conoce la concentración de plasminógeno. Esta metodología fue descrita por primera vez por Rollema H.S., Visser, S., Poll, J.K. en 1983, modificada en el mismo año por Korycka-Dahl, Ribadeau Dumas, Chene, N., Martal, J.. Ambos grupos de trabajo determinaron por esta técnica la plasmina en leche bovina. En líneas generales luego de un procesamiento de la leche para liberar la plasmina y el plasminógeno de las micelas de caseína, produjeron la reacción entre el sustrato y la muestra en un buffer de TRIS pH 7,4 incubando a 37° C. Constataron que el incremento de la absorbancia fue lineal hasta pasadas las tres horas.

En cada trabajo se define la actividad de la enzima según la plasmina comercial utilizada para realizar la curva de calibrado.

Siguiendo esta metodología diversos autores basaron sus estudios en esta reacción, variando en algunos casos el tripéptido utilizado pero siempre manteniendo la lisina en la unión con la p-nitroanilina, ya que la plasmina es específica para este aminoácido y extendieron el estudio a otros productos

lácteos, sobre todo en los quesos, donde se observó la incidencia de la plasmina en el proceso de maduración de los mismos. Al igual que el método fluorométrico, este método mide la enzima activa presente en la muestra.

También difieren los trabajos en relación a las unidades con que se presentan los valores hallados, encontrándose expresados en unidades de enzima/g.queso; $\mu\text{g. enzima/g. queso}$; $\text{mg.p-nitroanilina/g.queso/hora}$. (Richardson, B.C., Pearce, K.N. 1.981; Korycka-Dahl, M., Ribadeau-Dumas, B., Chene, N., Martal, J.. 1983; Schaar, J., Funke, H.. 1.986; Rollema, H.S., Poll, J.K., 1983; Ollikainen, P., Nyberg, K., 1988; Politis, I., Ng Kwai Hang, K.F. . 1.989; Politis, I., Barbano, D.M., Gorewit, R.C., 1992; Farkye, N.Y., Landkammer, C.F. 1.992 ; Bastian, E.D., Hansen, K.G., Brown, R.J., 1993; Lu, D.D., Nielsen, S., 1993; Politis, I., White, J.H., Zavizion, B., Goldberg, J.J., Guo, M.R., Kindstedt, P., 1994; Baldi, A., Savoini, G., Cheli, F., Tantuz, F., Senatore, E., Bertocchi, L., Politis, I., 1996; Bastian, E.D., Lo, C.G., David, K.M.M., 1997; Fajardo-Lira, C.E., Nielsen, S.S., 1998; Dupont, D.; Grappin, R.. 1998; Rampilli, M., Raja, V. 1.998; Hayes, K.D., Nielsen, S.S., 2000).

IV. 2. MUESTREO DE LOS QUESOS ANALIZADOS:

IV. 2.1. Muestras seleccionadas:

Se realizaron las determinaciones de plasmina y plasminógeno en diferentes quesos, de pasta blanda ó frescos, semidura y dura, de diversas marcas procedentes del comercio.

Dentro de los quesos de pasta dura, se utilizaron también quesos Reggianito elaborados en la planta piloto del Programa de Lactología Industrial (PROLAIN) de la Facultad de Ingeniería Química. Se incorporaron estos quesos en el estudio, ya que esto permite conocer exactamente las condiciones

tecnológicas de elaboración y maduración de los mismos. En uno de estos, se determinó asimismo la variación de actividad de plasmina y plasminógeno a tiempo cero (cuajada) y luego de seis meses de maduración.

Para seleccionar los quesos para la determinación de plasmina, se tuvieron en cuenta los parámetros generales de elaboración exigidos por el Código Alimentario Argentino, debido a que los mismos podrían influir en los niveles de plasmina y de plasminógeno. Es por ello que en la clasificación de los diferentes quesos realizada para el desarrollo de la experiencia se los agrupó según su cocción en el proceso de elaboración, en quesos de masa no cocida, semicocida y cocida.

Los quesos comerciales utilizados en el estudio se seleccionaron del mercado y pertenecieron a marcas de primer nivel.

Dentro de los quesos de masa no cocida (NC) se escogieron dos quesos Blancos (NC-B₁, NC-B₂), un queso Magro Natural Untable (NC-Ma), y un queso Cremoso (NC-Cr).

En el caso de los quesos semicocidos (SC) se escogió un queso Holanda (SC-Ho), un queso Gouda (SC-Go), dos quesos Por Salud (SC-PS₁, SC-PS₂), un queso Pategras (SC-Pa) y un queso Provolone (SC-Pr).

Dentro de los quesos de masa cocida (C) se seleccionaron tres quesos Reggianitos (C-R₁, C-R₂, C-R₃), y un queso Parmesano (C-Pa). En este grupo se incluyeron tres quesos Reggianito Experimentales elaborados en la planta piloto del PROLAIN (C-RE_{x1}, C-RE_{x2}, C-RE_{x3}).

De esta forma, se efectuó la determinación de plasmina en 18 muestras: 14 quesos comerciales diferentes distribuidos en no cocidos, semicocidos y cocidos, en tres quesos Reggianitos Experimentales y en una cuajada de éstos últimos. Para cada una de las muestras se realizaron cinco determinaciones.

Debido al costo de la enzima uroquinasa utilizada para la determinación del plasminógeno, no se pudo procesar el mismo número de determinaciones para esta cuantificación, motivo por el cuál se seleccionaron algunas muestras correspondientes a diferentes tipos de quesos (no cocidos, semicocidos, cocidos) para este estudio. También se determinó el plasminógeno en la cuajada del queso Reggianito Experimental.

IV. 2. 2. Plan de muestreo:

Para los quesos Holanda, Gouda, Pategras, se cortaron las secciones según se indica en el esquema "a" de la figura IV.3, en los quesos Reggianito y Parmesano según el esquema "b" y en el Cremoso según el esquema "c". En todos los casos se tomaron entre 100 y 150 gramos de queso.

Para los quesos Blancos y el Magro Natural se tomó la totalidad del queso contenido en potes de 250 gramos.

En el caso de los quesos Por Salut, se tomó la totalidad de la porción de 400 gramos que viene envasada al vacío de fábrica.

IV. 3. CARACTERÍSTICAS Y ADAPTACIONES DE LA METODOLOGÍA COLORIMÉTRICA SELECCIONADA PARA LA DETERMINACIÓN DE PLASMINA Y PLASMINÓGENO EN QUESOS:

IV. 3. 1. Fundamentos teóricos de la determinación :

La metodología colorimétrica fue adoptada por tratarse de una técnica simple, sensible, y la más utilizada, como así también por el hecho de que el equipamiento necesario es el que habitualmente se encuentra en un laboratorio de análisis de alimentos.

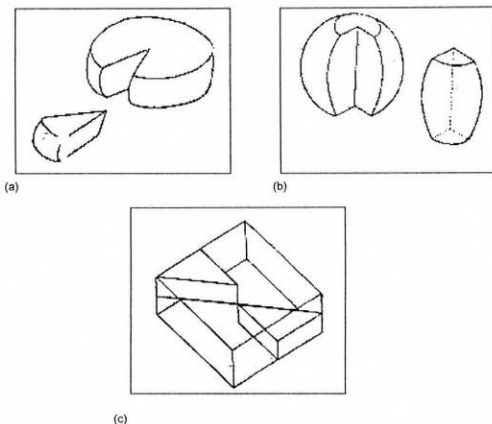


Fig. IV.3. Muestreo de una porción de un queso con sección transversal: a. Circular y de peso superior a 2.500 g., b. Circular y de peso entre 1.100 y 2.500 g., c. Paralelepípedo y forma cuadrada.

La reacción colorimétrica se fundamentó en la acción enzimática de la plasmina sobre el tripéptido cromogénico: D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilina utilizado como sustrato. Como resultado de esta acción enzimática, se libera para-nitroanilina cuya absorbancia se lee a 390 nm.

Para cuantificar el plasminógeno (precursor inactivo de la enzima) es necesario como paso previo, la activación del mismo con uroquinasa. Por lo tanto, se incubaron las muestras con uroquinasa determinándose luego la plasmina total de la muestra.

En la figura IV.4 se esquematiza el principio de la determinación.

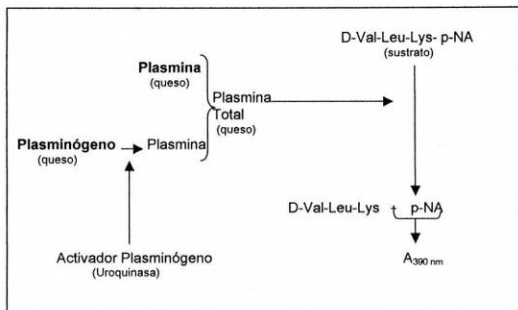


Fig. IV.4. Fundamento de la determinación de plasmina y plasminógeno.

Como ya se indicó, la plasmina y el plasminógeno se encuentran íntimamente asociados con la micela de caseína. Bastian E.D., Brown, R.J., Ernstrom, C.A. (1991) documentaron que la caseína actúa como un inhibidor competitivo de la plasmina. Esta inhibición es debida a que la caseína es el sustrato natural de la plasmina y compite con el tripéptido cromogénico, por este motivo los ensayos con este sustrato muestran un patrón de inhibición competitiva. Estos autores sugirieron que esta inhibición puede ser eliminada incrementando la concentración del sustrato cromogénico o disminuyendo la concentración de caseína. Indicaron que incrementando la concentración del sustrato (D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilina di-hidrocloruro) a concentraciones superiores a 0,4mM se puede eliminar la inhibición de la plasmina por la caseína. También se obtiene el mismo resultado disociando el plasminógeno y plasmina de la caseína para su medida posterior. Así se han desarrollado diversas técnicas que en general proponen el tratamiento de la muestra con ácido ϵ - aminocaproico ó citrato de sodio (Politis, I., Ng Kwai Hang, K.F., 1.989; Schaar, J., Funke, H., 1.986; Dupont, D., Grappin, R. 1998; Rampilli, M., Raja, V. 1.998).

Por este motivo en el desarrollo del presente trabajo se optó por la combinación de ambas alternativas, tratándose las muestras con citrato y utilizando el sustrato tripéptido a una concentración de 4,5 mM.

Por otro lado, la concentración utilizada del tripéptido garantiza no sólo evitar la inhibición por la posible presencia de caseína en la muestra, sino también que la velocidad de la reacción enzimática desarrollada se relacione linealmente con la concentración de la enzima independientemente de la del sustrato, siendo la velocidad de orden cero respecto a éste. Debido a que la ecuación de Henri-Michaelis-Menten, indica que la velocidad puede considerarse como la velocidad inicial verdadera o instantánea, sólo si la concentración del sustrato permanece prácticamente constante a lo largo del ensayo, es decir, si sólo reacciona una pequeña fracción de sustrato, la concentración utilizada del tripéptido cromogénico (4,5mM, preparada en buffer de reacción TRIS) fue lo suficientemente alta como para garantizar que no reaccione más de un 5% del mismo a lo largo del tiempo de ensayo (Segel, I.H., Ferst, A., 1991). Por otra parte las concentraciones utilizadas en los diversos trabajos analizados (Rampilli, Raja, 1998, Baldi, Savoini, Cheli, Fantuz, Senatore, Bertocchi, Politis 1996, Ollikainen, Nyberg, 1.988), fueron similares a la adoptada en este caso.

IV.3.2. Metodología de la determinación:

Los altos costos de los reactivos empleados determinaron que se utilizaran volúmenes del orden de los microlitros, por lo cual la reacción se adaptó para que se lleve a cabo en microcubetas. La reacción se realizó a 37° C, pH 7,4 y baja concentración de NaCl ya que son las condiciones óptimas de actividad de la plasmina .

Se hicieron reaccionar 25 μ l de muestra (queso ó cuajada) procesada según lo detallado en el punto IV.3.4 (sobrenadante obtenido de la microcentrifugación de la muestra en el tubo ependorf), 200 μ l de buffer [TRIS (Sigma, T 1378) 0.05 M en NaCl (Cicarelli, A.C.S., pro-análisis) 0.1M ajustando el pH a 7.4 con HCl (Cicarelli, A.C.S, pro-análisis)], y 25 μ l del sustrato 4,5 mM (D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilina di-hidrocloruro, Sigma Chemical Co., V 7127), incubando en baño maría (TECAM[®], Argentina) termostatzado a 37° C durante 180 minutos (Rampilli, Raja,1998, Baldi, Savoini, Cheli, Fantuz, Senatore, Bertocchi, Politis 1996, Ollikainen, Nyberg, 1.988).

Al finalizar la incubación se agregó cantidad suficiente de buffer para completar 600 μ l a los efectos de alcanzar el volumen mínimo de lectura en el espectrofotómetro, ya que no fue conveniente partir de este volumen de reacción debido a los costos de los reactivos, teniendo en cuenta esto en los cálculos que se expresan finalmente por gramo de muestra. Se leyó la absorbancia a 390 nm (IV.3.3) en un espectrofotómetro UV-VIS, Metrolab 1700, Argentina y de las curvas de calibrado se obtuvo el valor de plasmina expresado como mg p-nitroanilina/ml ó μ g.plasmina/ml.

Paralelamente se realizó la reacción sin la muestra para determinar la posible hidrólisis espontánea del sustrato peptídico (blanco de reactivos). En todos los casos esta hidrólisis resultó negativa. Con cada una de las muestras procesadas se realizó un blanco de muestra, efectuando el ensayo con la muestra y el buffer de reacción (TRIS), sin agregar el tripéptido.

Para determinar la fracción que se encontraba bajo la forma inactivada (plasminógeno), se utilizó la enzima activadora uroquinasa (Sigma Chemical Co., U 5004). Para ello se tomó como referencia la concentración utilizada por Rampilli, M. y Raja, V. (1998) preparando una solución de la enzima de 15 U/ml

en el mismo buffer de reacción (TRIS). Se incubó durante 30 minutos a 37° C, 5 µl. de esta solución de uroquinasa con 100 µl. de muestra procesada (queso o cuajada) (IV.3.4).

Luego de esta incubación se tomó el volumen correspondiente y se realizó la reacción tal como se detalló anteriormente. De esta manera se determinó la plasmina total de la muestra: la procedente del plasminógeno activado por la uroquinasa y la plasmina presente como tal en el queso. Luego, por diferencia entre el valor obtenido de plasmina total y la plasmina dosada en forma directa se obtuvo el valor del plasminógeno de la muestra.

IV. 3.3. Verificación de la longitud de onda de trabajo:

A los efectos de verificar la longitud de onda de trabajo, se realizó el espectro de absorción una solución 1,44 mM de p-nitroanilina en buffer TRIS 0,05M - NaCl 0,1M, ajustando el pH a 7,4, leyéndose la absorbancia entre 350 y 450 nm.

IV. 3. 4. Preparación de las muestras:

En la bibliografía se hallaron diferentes métodos de procesamiento de las muestras de quesos. Las variantes entre los diversos autores se presentan en el buffer de disgregación de muestra utilizado, o, para un mismo buffer, en las concentraciones empleadas. El pH varió entre 7 y 8,5 según el autor y también se diferenciaron otras variables tales como: tiempo, temperatura y velocidad de centrifugados, etc.. (Ollikainen, P., Nyberg, K. , 1.988; Richardson, B.C., Pearce, K.N., 1.981; Farkye, N.Y, Landkammer, C.F. 1.992; Dupont, D., Grappin, R., 1.998).

Si bien esta metodología ha sido aplicada por numerosos investigadores (IV.1.3), teniendo en cuenta lo antedicho, se ensayaron diversos tratamientos de muestra.

Una primera prueba se realizó tomando 5 gramos de queso Holanda, los que fueron disgregados en un mortero con 15 ml de buffer TRIS 0.05 M - NaCl 0.1 M a pH 7.4, filtrándose luego con papel de filtro. Se obtuvo un filtrado extremadamente turbio. Como consecuencia de ello, se volvió a procesar otra muestra finamente dividida en mortero con el agregado de 15 ml. del mismo buffer, luego se agitó durante un minuto en vórtex (Vórtex Standard 10, Fab. Aparatos Científicos FAC[®], Argentina) a los efectos de lograr una óptima homogeneización; luego se centrifugó durante diez minutos en una macrocentrífuga (Rolco[®], Argentina) a 8.000 r.p.m. y el sobrenadante resultante se volvió a centrifugar durante cinco minutos en una microcentrífuga (ECYS[®], Argentina) a 14.000 r.p.m., obteniéndose de esta última centrifugación un sobrenadante con una muy leve turbidez y un escaso sedimento.

A fin de determinar la conveniencia de utilizar como buffer de disgregación citrato de sodio o TRIS (los dos buffer utilizados en los trabajos descriptos), se trataron por separado muestras de queso con cada buffer y, en el caso del citrato para dos concentraciones diferentes, observando cuál respondía de mejor forma a la extracción de la plasmína.

El tratamiento se realizó por duplicado para cada buffer, se tomaron 5 g. de queso Holanda, se dividieron finamente y se disgregaron en un mortero con 15 mililitros de cada buffer. Cada muestra con su buffer se transfirió a un tubo apropiado (Falcon), se dejó con el buffer 10 minutos a 37° C, agitando periódicamente, luego se agitó un minuto en vórtex, quedando así soluciones relativamente homogéneas, posteriormente se continuó con el procesamiento de cada muestra