

MADURACIÓN DE QUESOS DE PASTA PRENSADA, COCIDA Y SEMI-COCIDA: ESTUDIO DE LOS AGENTES PROTEOLÍTICOS INTERVINIENTES: LA PLASMINA. CARACTERIZACIÓN DE SU MATRIZ PROTEICA.

GRACIELA MUSET

**DIRECTORA: Dra. MIRTA EVA VALENCIA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR DE LA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**



a mis padres, mis raíces

a Roberto, Tomás y Manuela

a mi familia

a mis amigos

Agradezco especialmente a la Dra. Mirta Valencia la confianza que me brindó y permitió iniciar este largo camino, la paciencia para la discusión y lectura minuciosa de los resultados y los consejos amables y oportunos que hicieron posible concluirlo.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Tecnología Industrial por haber apoyado mi formación profesional desde 1978.

Al Centro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Láctea, por permitirme realizar el trabajo necesario para llevar adelante la tesis en el ámbito del Centro.

Al Lic. Roberto Castañeda, Director Técnico del INTI-Lácteos, por la lectura crítica y las sugerencias que permitieron enriquecer la redacción de este trabajo.

A mis compañeros de trabajo, por interesarse en los temas del presente trabajo y compartir sus días en el laboratorio.

Al Institut National de la Recherche Agronomique, por haber financiado una beca que hizo posible el comienzo del trabajo en su Estación Experimental Lechera en Poligny, Francia.

A la memoria de Remy Grappin, Director de esa Estación, por haber confiado en mi solvencia profesional para llevar adelante este trabajo.

A Didier Dupont por su amable y constante discusión y consejo.

A Gabriel Duboz por su asistencia en la elaboración de los quesos y en el manejo de la planta piloto, Sylvie Pochet por su seguimiento para el desarrollo del estudio de la fracción proteica y Odile Rolet Repecaud por asesorarme en las técnicas de ELISA.

A Germán Aranibar por haber realizado los cálculos estadísticos que me permitieron completar la presentación del presente trabajo.

Al personal de la Estación Experimental del INRA, Poligny, por colaborar con algunos ensayos analíticos y por su buena predisposición para compartir sus días conmigo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Generalidades	9
1.2. La elaboración del queso	11
1.3. Proceso de maduración	13
1.4. Proteolisis	15
1.4.1. Aspectos generales	15
1.4.2. Acción del coagulante	17
1.4.3. Acción de las bacterias ácido lácticas (BAL)	19
1.4.4. Acción de las bacterias no starter (NSLAB)	21
1.4.5. Acción de las enzimas nativas de la leche: <i>la plasmina</i>	22
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. Elaboración de los quesos	30
3.2. Análisis de los quesos	37
3.2.1. Evaluación de la composición de los quesos	37
3.2.2. Determinación de la concentración de plasmina y plasminógeno en las muestras de queso.	39
3.2.3. Determinación de las actividades de plasmina y de la derivada del plasminógeno en muestras de queso.	41
3.2.4. Estudio de la proteólisis	42
3.2.4.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida-Urea de la fracción nitrogenada insoluble a pH 4.4	42
3.2.4.2. Análisis por HPLC en fase reversa de la fase soluble a pH 4.4.	43
3.3. Análisis estadístico	45
3.3.1. Análisis de varianza.	46
3.3.2. Análisis de componentes principales (ACP)	46
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	

4.1. Ensayo 1: efecto de la temperatura de cocción de la cuajada en la retención del par PLM-PLG y en la actividad de la plasmina y la derivada del plasminógeno en la proteólisis primaria y secundaria durante la maduración de los quesos.	
4.1.1. Composición de los quesos	47
4.1.2. Concentración de plasmina y plasminógeno	50
4.1.3. Actividad de plasmina y derivada del PLG	58
4.1.4. Indicadores de la proteólisis	61
4.1.4.1. Evaluación del nitrógeno soluble	61
4.1.4.2. Degradación de la fracción caseínica	63
4.1.4.3. Análisis de la fracción soluble a ph 4.4	69
4.1.5. Conclusiones	73
4.2. Ensayo 2: efecto del tiempo de mantenimiento de la temperatura de cocción de la cuajada, en la retención del par PLM-PLG y en la actividad de la plasmina y la derivada de su precursor, el plasminógeno, en la proteólisis primaria y durante la maduración de los quesos.	76
4.2.1. Composición de los quesos	76
4.2.2. Concentración de plasmina y plasminógeno	78
4.2.3. Actividad de plasmina y derivada del PLG	82
4.2.4. Indicadores de la proteólisis	83
4.2.4.1. Evaluación del nitrógeno soluble	83
4.2.4.2. Degradación de la fracción caseínica	84
4.2.4.3. Análisis de la fracción soluble a ph 4.4	89
4.2.5. Conclusiones	91
4.3. Ensayo 3: efecto de la tecnología de elaboración de distintas variedades de quesos en la retención del par PLM-PLG y en la actividad de la plasmina y la derivada de su precursor, el plasminógeno, en la proteólisis primaria y secundaria durante la maduración.	92
4.3.1. Composición de los quesos	92
4.3.2. Concentración de la plasmina	
4.3.2.1. Concentración de plasmina y plasminógeno	96
4.3.2. 2. Actividad de plasmina y derivada del PLG	100

4.3.3. Indicadores de la proteolisis	103
4.3.3.1. Evaluación de la fracción nitrogenada	103
4.3.3.2. Degradación de la fracción caseínica	104
4.3.3.3. Análisis de la fracción soluble a ph 4.4	110
4.3.4. Conclusiones	114
4.4. Ensayo 4: estudio de la acción de las enzimas plasmina y quimosina durante las distintas etapas de la elaboración y la maduración de distintas variedades de quesos. Efecto de la tecnología.	116
4.4.1. Indicadores de la proteolisis	116
4.4.1.1. Degradación de la fracción caseínica	116
4.4.2. Conclusiones	130
4.5. Análisis de Componentes Principales (ACP)	131
5. CONCLUSIONES GENERALES	136
6. REFERENCIAS	141
ANEXO 1	151



1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES

Antes del siglo XVI una gran parte del mundo ignoraba los quesos: no solamente las regiones tropicales húmedas y cálidas en las cuales el clima era poco favorable para su conservación, sino también en nuestro continente americano desprovisto de animales lecheros domesticados. Dos regiones contiguas formaban el mundo del consumo de quesos que correspondían, por otro lado, a los dos procedimientos utilizados para la coagulación de la leche: las estepas y desiertos del Viejo Mundo donde los pastores nómades utilizaban la leche acidificada por la fermentación láctica para obtener una cuajada prensada que era luego salada, y el mundo mediterráneo extendido a Europa donde la cuajada era preparada por la acción enzimática del coagulante. Durante el curso de los últimos cinco siglos, este mapa se fue modificando por la creciente cría y consiguiente población de animales bovinos y ovinos en América, la valorización de la zona austral, los progresos científicos e industriales, el crecimiento del consumo mundial, etc.

La industria quesera se consolida en la Argentina en el siglo XIX. El censo de 1869 registra la existencia de 22 queserías en Buenos Aires, que ocupaban a 210 empleados. A partir de aquella época se produjo una expansión de la actividad, que hoy es fuerte y pujante.

El queso es hoy, uno de los alimentos más nutritivos y sabrosos y existe en casi todos los rincones del mundo, desde aquéllos puramente regionales (el Tafi de nuestro NOA, por ej.) hasta los favoritos reconocidos internacionalmente como el Saint Paulin, Port salut, Gouda, Grana Padano, Roquefort, etc.

El queso es el producto de una región y de su pueblo. De hecho, toda la serie de quesos del mundo deben su existencia no solamente a la fecundidad de la imaginaria humana, sino también a un sinnúmero de otros factores que constituyen el medio en el cual ellos viven: clima, suelo, vegetación, altitud, estado de desarrollo económico de la región, tipo y raza de animales lecheros y gusto y preferencias de los consumidores a los cuales será destinado de acuerdo a las costumbres regionales. De esta forma, como

producto de consumo diario las preferencias varían de acuerdo a la región. Podemos nombrar, entre otros, el Camembert francés, el Parmiggiano Reggiano italiano, el Cheddar preferido de Inglaterra, el Gouda de Holanda, el Queso Fresco de México sazonado con chili y especias, los de pasta semidura como el Mar del Plata argentino, etc.

La elaboración de los quesos ha sido un *métier* doméstico, artesanal, que se convirtió en un arte y a su vez un arte que se convirtió en una industria. De hecho, la mayor parte de los quesos de gran importancia continúan siendo fabricados de acuerdo a métodos tradicionales que han evolucionado tecnológicamente y a prácticas que fueron transmitidas a través de varias generaciones.

A diferencia de otros productos alimenticios procesados para los cuales la estabilidad es un criterio clave para la calidad, el queso es un producto bioquímicamente dinámico y en su matriz se producen cambios significativos durante su período de maduración. Las cuajadas recién elaboradas de distintas variedades de quesos tienen textura y flavor similares. Es durante la maduración que se producen los compuestos del flavor y

textura que caracterizan cada tipo de queso.

Los fenómenos metabólicos que conducen a la obtención del queso han sido objeto de numerosas investigaciones que se han llevado a cabo durante los últimos años. A pesar de ello, no se conocen aún todos los mecanismos bioquímicos por los cuales la leche se transforma en textura y flavor de ese delicioso alimento que combina placer y nutrición denominado QUESO.



*Maitre Corbeau, sur un arbre perché,
Tenait en son bec un fromage...
Jean de La Fontaine, Fables.*

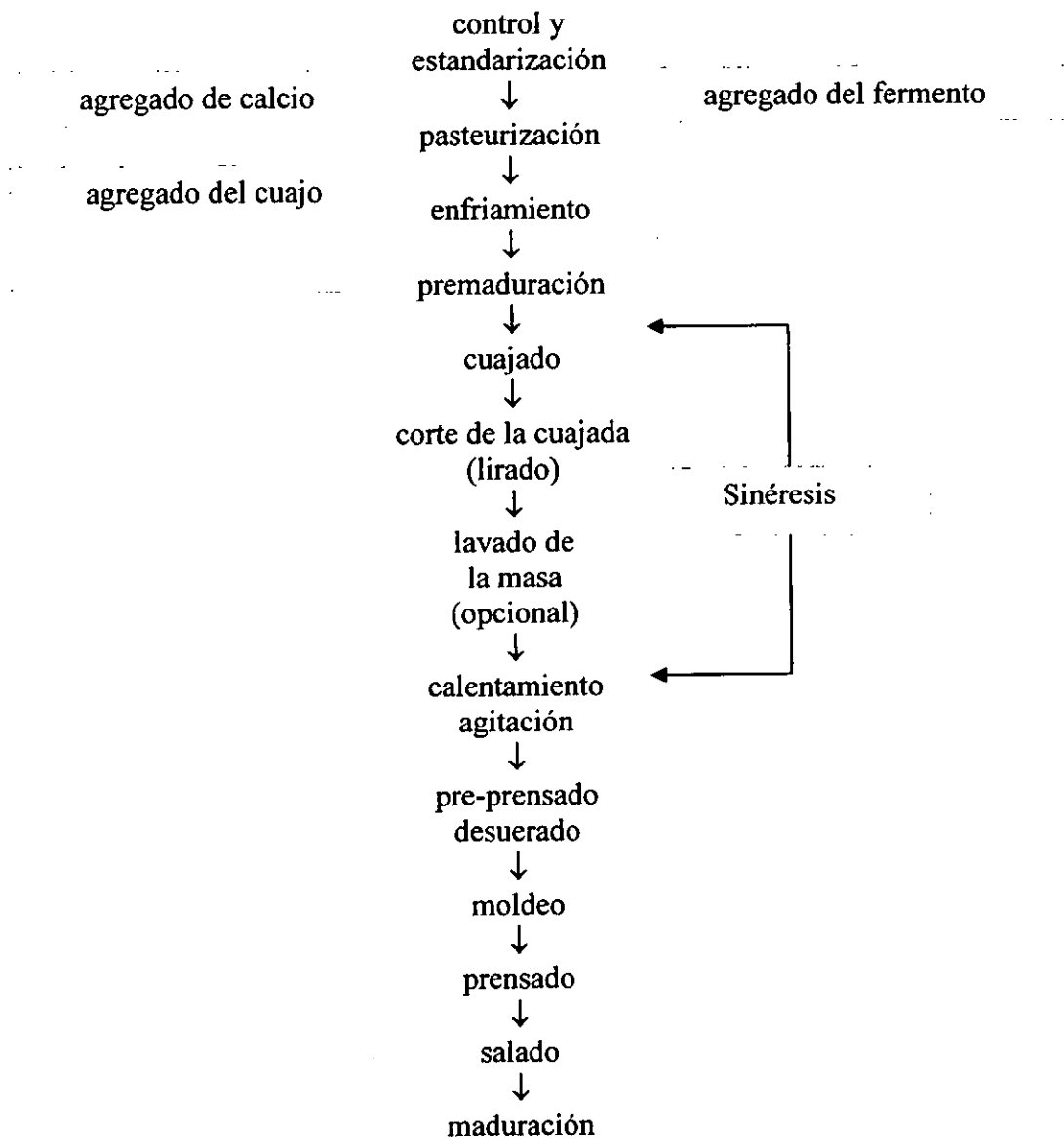
Fábula de *Jean de La Fontaine*

El señor cuervo, sobre un árbol curvado, sostenía en su pico un queso.

1.2. LA ELABORACIÓN DEL QUESO.

La tecnología básica de fabricación de un queso es similar para casi todas las variedades. Pero es importante mencionar que cambios relativamente pequeños en las condiciones de elaboración dan lugar a importantes diferencias en el producto final. En general estas diferencias residen en la utilización de distintos tipos de fermentos, temperaturas de cocción, corte de la cuajada, lavado de la masa, tamaño del grano de la cuajada, tiempos de salmuera y maduración, y otras condiciones tecnológicas como temperatura y humedad relativa de las cámaras.

El proceso de elaboración de un queso con coagulación enzimática, tales como los quesos de pasta prensada, prensada cocida o semicocida consta de distintas etapas para llegar al producto final que pueden ser representados en el siguiente esquema:



Según Castañeda et al., 2005; Ramírez, 2005; Salazar et al. 1999; Salvadori del Prato, 1998; entre las referencias más recientes así como Davies, 1965, Kosikowski (1970) Veisseyre, 1980 y Eck (1987) entre los clásicos estudiosos de los procesos de transformación de la leche, las distintas etapas para la elaboración de quesos pueden resumirse en el siguiente esquema.

Control y estandarización de la leche: antes del llenado de la tina quesera, se controla su color, sabor, olor, acidez o pH, materia grasa y ausencia de residuos de antibióticos. A continuación se estandariza el tenor de materia grasa y se filtra, para retener macro impurezas.

Pasteurización: etapa que en nuestro país debe realizarse obligatoriamente cuando se elaboran quesos semiduros y de pasta blanda (Código Alimentario Argentino) de menos de 3 meses de maduración. Esta puede realizarse en la propia tina o mediante equipos de pasteurización a placas u otros.

Premaduración: antes del agregado del coagulante la leche debe acidificarse con bacterias ácido lácticas (BAL), lo cual se logra con fermentos puros y mezclas seleccionadas o con fermentos naturales (suerofermento u otros). En esta etapa se puede agregar cloruro de calcio, colorante y nitratos si correspondiera.

Cuajado: es la formación, por acción del coagulante, de una red proteica que contiene los glóbulos de grasa y el fosfato de calcio coloidal, formándose un gel.

Corte de la cuajada: para promover la sinéresis, es decir la separación del suero y la retracción de la cuajada, se corta prolijamente el gel en pequeños cubos con instrumentos cortantes llamados "liras". Se aumenta así la superficie total por donde éste puede perder agua.

Sinéresis: es el proceso por el cual el suero abandona el grano de queso. Puede facilitarse con uno o varios de los procedimientos siguientes:

- a) mediante la agitación con la propia lira u otra más fina, más lentamente al principio y luego con mayor rapidez, manteniendo los granos flotando;
- b) realizando el mismo proceso de agitación anterior, pero calentando el conjunto. Esta operación se denomina generalmente cocción o trabajo en tina a temperatura; y

Lavado: es el reemplazo de parte del suero con agua a la misma temperatura o mayor, promoviendo la eliminación de parte de la lactosa y evitando una excesiva acidificación.

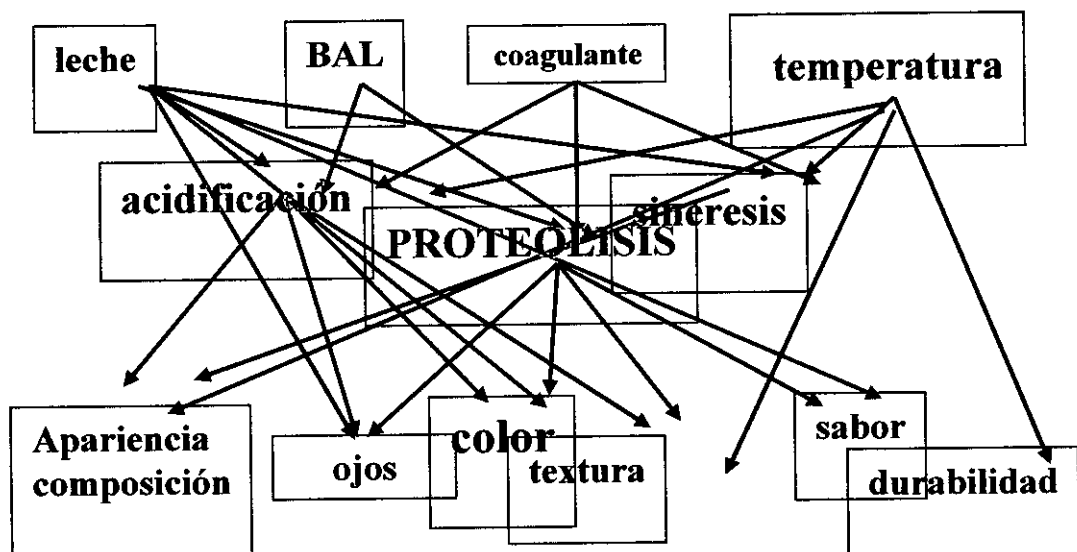
características finales del queso, la evolución de las proteínas y los agentes responsables de su degradación son los que presentan mayor importancia, tanto durante las primeras etapas de la elaboración como en el proceso de maduración. En la actualidad, hay evidencias de que ésta comienza en estadios tan iniciales como es el del trabajo en tina y continúa constantemente hasta la etapa que cubre el período de maduración para alcanzar las características de textura y flavor del producto final.

1.4. PROTEOLISIS

1.4.1. ASPECTOS GENERALES

El fenómeno de la proteólisis ha sido estudiado en profundidad por numerosos grupos de investigadores y se han realizado muchos trabajos de revisión (Grappin et al., 1985; Fox, 1989, Fox y Law, 1991, Fox et al., 1995; Gomez et al., 1997; Fox y Mc Sweeney, 1996 y Mc Sweeney, 2004 entre otros). Sin embargo, dada la complejidad de la matriz caseínica y la cantidad de compuestos involucrados en la misma, así como la combinación de factores que alteran el metabolismo, existen numerosas líneas de trabajo que tienden a despejar algunos interrogantes aún presentes.

La proteólisis no puede ser descripta sólo de una manera. Hay una gran variedad de enzimas responsables de la misma y muchas actividades enzimáticas están involucradas. El estudio del tipo y extensión de la proteólisis es un aspecto interesante para definir el tipo de queso y el grado de maduración alcanzado. La siguiente figura intenta mostrar la multiplicidad de actores y factores que intervienen en el proceso de transformación de la materia prima en producto.



La proteólisis cumple un rol fundamental en: i) los cambios de textura en la cuajada debidos al rompimiento de la red proteica, a la disminución de la a_w debido a la unión con agua de los grupos carboxilo y amino liberados y al incremento del pH, ii) la contribución directa al flavor y tal vez también a los off-flavors del queso (como el amargor) a través de la formación de péptidos y aminoácidos libres, iii) la liberación de sustratos para producir cambios catabólicos secundarios como por ej. deaminación, decarboxilación, transaminación, etc.) y iv) cambios en la matriz del queso que facilitan la liberación de compuestos sápidos durante la masticación (Mc Sweeney y Sousa, 1998; Mc Sweeney, 2004; Steele y Broadbent, 2005).

Durante la maduración, la proteólisis está catalizada por diversas enzimas provenientes de distintas fuentes: i) del coagulante, ii) de la leche iii) de los fermentos, iv) de las bacterias no *starter*, v) *starters* secundarios y vi) proteasas exógenas y/o peptidasas que pudieran adicionarse para impulsar o acelerar la maduración. Estas actúan en sucesión durante el proceso de elaboración y maduración de modo tal que los productos de algunas actividades enzimáticas sean los sustratos de otras, siendo el producto final una consecuencia de la cadena completa de reacciones (IDF-FIL 337/99).

Los cuatro agentes proteolíticos mencionados en primer lugar, son los responsables de los principales procesos metabólicos ocurridos durante el proceso de elaboración y maduración de los quesos. Se considera necesario ampliar la información relacionada con la actividad de los mismos.

En la mayoría de las variedades de quesos, la hidrólisis inicial de las caseínas conocida como *proteólisis primaria*, está causada por la acción del coagulante y en menor medida por la plasmina y proteasas de las células somáticas, como la catepsina D, que dan como resultado de su acción la formación de péptidos grandes e intermedios, insolubles y solubles en agua, respectivamente. Éstos son luego degradados por el coagulante residual, la plasmina y las enzimas del *starter* o bacterias ácido lácticas, BAL. La producción de péptidos pequeños y aminoácidos libres es producto de la acción de las peptidasas microbianas, encontradas en el interior celular (Muset et al., 1989; Monnet et al., 2000). El proceso descrito, conocido como *proteólisis secundaria*, lleva a la formación de componentes que participan en la formación del aroma del queso, pero poco a la intensidad

del mismo. Los componentes aromáticos, se forman durante la degradación de los aminoácidos en una gran variedad de componentes volátiles (Thierry et al, 2002).

Fox y Wallace (1997) sugirieron que el flavor y la concentración de aminoácidos no podían ser correlacionados ya que distintos quesos (por ej. Gouda, Edam, entre otros) tienen flavour muy distintos y sin embargo, la concentración y proporciones relativas de aminoácidos libres son generalmente similares. Esto sugiere que la producción de aminoácidos no es el paso limitante en la maduración de quesos sino que el factor crítico sería la modificación química o enzimática de estos aminoácidos (Fox y McSweeney, 1996; Steele y Broadbent, 2004).

1.4.2. Acción del COAGULANTE

Muchas enzimas provocan la coagulación de la leche. Son proteasas ácidas cuyo efecto coagulante deriva de la capacidad de las mismas de hidrolizar el enlace fenilalanina – metionina (enlace 105-106) de la κ -caseína. La hidrólisis de este enlace le quita a la κ -caseína su efecto de coloide protector de la micela caseínica provocando la formación de para- κ -caseína y la fracción terminal de 106-199 conocido como el caseínoglicopéptido (CMP) de aproximadamente 7000 Da y que contiene cerca del 30% de hidratos de carbono de la caseína. La mayor parte CMP es liberado al suero, sin embargo la para κ -caseína permanece asociada a la micela caseínica y es incorporado al queso. Las α_{s1} -, α_{s2} - y β -caseínas no son hidrolizadas durante la coagulación, pero pueden ser modificadas durante las siguientes etapas de elaboración y maduración.

Tradicionalmente, la enzima coagulante utilizada ha sido la quimosina proveniente del cuarto estómago de terneros. Otras también utilizadas son la pepsina bovina y porcina, enzimas microbianas y la quimosina obtenida por ingeniería genética. La acción de estas enzimas depende del pH (debe ser cercano a 6), de su temperatura óptima (35 °C) y del contenido en sales minerales, especialmente calcio.

Como se mencionara anteriormente la hidrólisis inicial de las caseínas está causada por la acción del coagulante y en menor medida por la plasmina y proteasas de las células somáticas. Su papel aparece como importante, no sólo por su acción en la masa del queso, sino como precursor e iniciador del proceso de degradación proteica que es la base de la maduración.

Durante el proceso de elaboración del queso, solamente entre el 3-5 % del coagulante agregado a la leche es retenido en la cuajada. Este porcentaje es independiente del pH de coagulación, si se trata de enzimas provenientes de *Mucor miehei* y *Mucor pusillus*, contrariamente a lo que ocurre con la quimosina y la pepsina bovina para las cuales, el porcentaje de enzima retenida es mayor a menor valores de pH para la cuajada. En el caso particular de los quesos de pasta prensada cocida, la estabilidad de las enzimas coagulantes dependerá del pH y temperatura de cocción. Mietton et al. (1994) mencionan que el tiempo necesario para reducir 10 veces la actividad coagulante de un cuajo bovino es de 33 minutos a 51 °C cuando el pH es de 6.5, mientras que la pepsina bovina requiere sólo 14 minutos para alcanzar la misma reducción. En el caso de los quesos tipo Grana, Emmenthal, Mozzarella (proceso de hilado), la actividad del coagulante se ve fuertemente disminuida durante la elaboración. Sin embargo la actividad proteolítica residual en la masa juega un rol fundamental en la maduración (Salvadori del Prato, 1998). La actividad durante el período de maduración dependerá también de la dosis de coagulante utilizada. A mayor concentración utilizada, mayor será la retención del mismo y el efecto sobre la reología y la sinéresis de la cuajada conduciendo a una degradación más pronunciada.

Otro factor a considerar es la composición del coagulante. En relación a otros coagulantes, la quimosina es débilmente proteolítica, y de hecho esta característica debe ser considerada cuando se selecciona un coagulante sustituto. La proteólisis es más intensa y rápida a medida que la concentración de pepsina bovina es mayor. Se debe observar que en Argentina se han utilizado durante mucho tiempo coagulantes obtenidos de animales adultos con un porcentaje de pepsina bovina mayor a 85% como práctica rutinaria (Muset, 1981).

La proteólisis inicial se observa ya en la etapa de trabajo en tina donde aparece la α_{s1} -I caseína (Muset et al., 1987; Hynes, 1999, 2001). Éste sería uno de los eventos responsables de la texturización de la cuajada. La proteólisis secundaria sería responsable de la formación de compuestos del sabor del queso, pudiendo producirse algunos péptidos que presentan sabor amargo y que constituyen luego el sustrato para la degradación proteica posterior operada por las enzimas de las bacterias lácticas (Salvadori del Prato, 1998). Las enzimas coagulantes utilizadas en quesería actúan débilmente sobre la β -caseína debido a

interacciones hidrofóbicas de la fracción hidrofóbica de la región C-terminal de la β -caseína (Mc. Sweeney, 2004).

De acuerdo a teorías recientes, la acción proteolítica de las enzimas coagulantes y especialmente de la quimosina en la maduración podría representar un papel más importante que el de las enzimas provenientes de la lisis de la microflora (Van der Berg, 1995). Numerosos autores han contribuido a estudiar las enzimas coagulantes.

1.4.3. Acción de las BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)

En la tecnología casearia, las BAL intervienen a lo largo de los diferentes procesos de transformación de la leche en queso. Por su actividad acidificante, ellas condicionan la aptitud de la leche a la coagulación, la calidad del gel y de la cuajada y la composición final del queso. La producción de ácido láctico es una de sus principales funciones. Prácticamente, se deben tener en cuenta dos aspectos importantes: la velocidad y el nivel máximo de producción, ya que existen diferencias importantes entre los géneros, especies y aún entre cepas de una misma especie bacteriana. Así, la cantidad de ácido láctico producida por especies del género *Lactobacillus* es generalmente mayor que aquella producida por los fermentos utilizados industrialmente de *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*.

La fermentación láctica no conduce solamente a la producción de ácido láctico sino que también se forman compuestos secundarios tales como ácido fórmico, acético, diacetilo, acetoina, acetaldehído y otros que participan en el desarrollo del aroma y sabor de los quesos.

Las BAL, generalmente son utilizadas industrialmente bajo la forma de fermentos complejos formados por mezclas de cepas. Si bien éstas son débilmente proteolíticas, dan origen a cantidades apreciables de nitrógeno soluble debido a que poseen un sistema proteinasa/peptidásico potente. Se ha demostrado que existe un sistema de proteolisis complejo y que éste es el responsable de su actividad asociada a dos categorías diferentes de enzimas: 1) proteinasas, que pueden hidrolizar proteínas nativas, y 2) peptidasas, que pueden romper uniones peptídicas de los péptidos producidos por la acción de las proteinasas para dar como resultado péptidos pequeños y aminoácidos libres que, sólo o previo catabolismo y/o combinación con otros compuestos, son la base del sabor y el

aroma. Estas enzimas pueden estar localizadas asociadas a la pared y al interior celular y se liberan al medio en el momento de la lisis (Fernández-Espla et al. 2000 entre otros).

Las BAL tienen requerimientos nutricionales exigentes. Además de requerir fuentes de aminoácidos, vitaminas y nucleótidos, necesitan también un suministro exógeno de carbohidratos. La concentración de aminoácidos libres y péptidos en leche es de alrededor de 0.1 mg/ml, lo que equivale a 5-20 % de la cantidad requerida para su máximo crecimiento en un medio sintético. La concentración de aminoácidos esenciales generalmente está por debajo del mínimo requerido para la síntesis proteica por las células de las BAL.

Como durante la fase de crecimiento exponencial, los requerimientos de distintas formas de nitrógeno disponible son muy elevados, es indispensable la existencia de un sistema enzimático extracelular. Se sugirió que los estreptococos del grupo N son capaces de segregar una proteinasa libre específica que puede distinguirse de las que se encuentran asociadas a la pared celular de acuerdo a los distintos requerimientos de calcio (Monnet et al., 1987; Fernández-Espla et al., 2000; Courtin et al., 2002).

El sistema enzimático proteolítico asociado a la pared celular cataliza la hidrólisis de las proteínas de la leche para dar péptidos conteniendo de 7 a 16 residuos de aminoácidos. Estos péptidos deben ser degradados posteriormente por las endo y exopeptidasas ubicadas preferentemente en el interior o exterior de la membrana celular a unidades de aminoácidos y péptidos transportables de 4 a 6 residuos. Subsecuentemente, una variedad de peptidasas (PepO, PepF), aminopeptidasas (PepN, PepA, PepC, PCP), prolina peptidasas (PepX, PepI, PepR, PepQ, PepP), dipeptidasas (PepD, PepDA) y tripeptidasas (PepT) citoplasmáticas completan la hidrólisis de péptidos a aminoácidos (Rul et al., 1994; Bauquis, 2004; Mc. Sweeney, 2004).

En los últimos 15 años se intensificó la investigación sobre la expresión de actividades peptidásicas y líticas de las bacterias ácido lácticas (BAL) como unas de las principales enzimas intervinientes en la transformación que ocurre durante la maduración (Heliuck et al., 2004; Bauquis, 2004; Algaron et al. 2004).

Un grupo muy utilizado industrialmente como *starter* es el de los lactococos mesófilos. Son homofermentativos, moderadamente proteolíticos y poseen un rango de actividad entre pH 5.5 y 6.2 con temperatura óptima alrededor de 30 °C. En este grupo de bacterias lácticas se ha puesto en evidencia la presencia de cepas Prt + y Prt – en relación a su capacidad de coagular la leche más o menos velozmente y la habilidad para hidrolizar las α_{s1} y β -caseínas, así como la Leucina-p-nitroanilida, pLNA (Beal et al., 1994; Guerrero y Muset, 1996, 1997; Lane y Fox, 1997). El grupo Prt – posee menor actividad acidificante y proteolítica ya que está desprovista de las enzimas asociadas a la pared celular y, de acuerdo a lo informado por algunos autores, tienden a producir menores defectos de amargor (Castañeda et al. 1990, 1991; Mietton et al. 1994). Reviste un amplio interés utilizar fermentos compuestos por cepas mixtas, donde haya por lo menos 35% de cepas Prt +. Muchas veces, se las acompaña del *S. thermophilus* como medio de acidificación.

Otro grupo de BAL corrientemente utilizado para la fabricación de quesos de pasta prensada cocida es el conformado por los estreptococos y los lactobacilos termófilos. El conocimiento relacionado con estas bacterias termófilas, se representa con dos especies bacterianas: *S. thermophilus* y el *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus*. La evolución de la población de estos microorganismos es generalmente bifásica: al comienzo se privilegia el crecimiento del *S. thermophilus* estimulado por la actividad proteolítica del Lactobacilo y luego el crecimiento del *Lb. bulgaricus* que será mucho más resistente a pH ácido. De acuerdo a Rul et al. (1994) y Roissart y Luquet (1994) los estreptococos termófilos son un género menos proteolítico que los lactococos mesófilos, pero su acción proteolítica está fuertemente influenciada por la simbiosis con los lactobacilos.

1.4.4 Acción de las BACTERIAS NO STARTER (NSLAB)

En la cuajada y masa del queso, en el primer estadio de la maduración, la flora microbiana no láctica puede alcanzar poblaciones de 10^7 - 10^8 ufc/g especialmente en los quesos producidos con leche cruda. En cambio, si bien su número inicial es bajo en los quesos elaborados con leche pasteurizada (< 50 ufc/g), éste crece rápidamente hasta alcanzar los niveles de 10^7 ufc/g en 4 semanas y permanece relativamente constante a partir de ese momento durante el período de maduración (Folkerstma et al., 1996). Esta población desempeña un rol fundamental en el proceso de la maduración aportando sus bacterias enzimáticas.

Así, dependiendo de la velocidad de muerte del fermento, las NSLAB pueden dominar la microflora viable en los quesos durante su maduración. La actividad de las NSLAB parece complementar la acción proteolítica de los *starters* produciendo péptidos de bajo PM y aminoácidos libres. Son generalmente lactobacilos heterofermentativos facultativos cuyos ejemplos más representativos son el *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* y *Lb. curvatum*. Éstos son uno de los pocos factores no controlados de la elaboración de quesos y puede ser el origen de varios defectos aunque también pueden presentar efectos benéficos como la intensificación del sabor y aroma y la reducción de los tiempos de maduración (Buchin et al., 2004; Ortigosa et al., 2004).

1.4.5. Acción de las ENZIMAS NATIVAS DE LA LECHE: la plasmina

La leche contiene más de 30 enzimas diferentes. Muchas de ellas no son importantes desde el punto de vista de la maduración, pero algunas de las enzimas lipolíticas y proteolíticas pueden contribuir a la misma de acuerdo al tratamiento térmico que sufriera la leche materia prima. En quesos elaborados con leche cruda, las lipasas y proteinasas provenientes de la microflora de la leche juegan un papel decisivo. En el caso de los quesos elaborados con leche pasteurizada, se genera una inactivación parcial de las mismas, pero aún pequeñas concentraciones durante un largo plazo, pueden influir en el proceso de la maduración.

Una de las enzimas de la leche responsables de la proteólisis primaria de los quesos es la proteinasa nativa de leche denominada plasmina (PLM) (EC 3.4.21.7). Su sistema proteolítico es muy complejo y, en la leche, se encuentra junto a su zimógeno inactivo, el plasminógeno (PLG), que es transformado parcialmente en plasmina en la glándula mamaria durante el almacenamiento por acción enzimática del activador tisular del PLG (t-PA), y el activador del tipo de la uroquinasa (u-PA).

La plasmina es una proteinasa a serina tipo tripsina de 80.000 kDa. Es de origen sanguíneo y su función fisiológica es la solubilización de los coágulos de fibrina. Su actividad puede desarrollarse a pHs alcalinos entre 5 y 9, con el óptimo a alrededor de 7.5 a 35 °C. Es altamente específica hacia uniones peptídicas que involucran a la lisina y en menor medida a la arginina formando parte del grupo carboxilo. En leche, su actividad se manifiesta preferentemente hacia las β y la α_{s2} -caseínas.

Mientras el PLG y la PLM están íntimamente asociadas con las micelas de la caseína, como la mayoría de las moléculas de sus activadores t-PA y u-PA, (Lu y Nielsen, 1993; Bastian y Brown, 1996; Fantuz et al., 1998), los inhibidores de la plasmina así como los inhibidores del activador del plasminógeno (PAI1) se encuentran con mayor frecuencia en el suero de quesería (Bastian y Brown, 1996; Precetti et al., 1997).

En el proceso de elaboración de los quesos, entre el 60 y el 90% de la plasmina que se encuentra presente en la leche, es retenida en la cuajada, (Dupont et al., 1998a; Collin et al., 1988 y Lawrence et al., 1987) y permanece activa en la masa. Se ha observado que el 70 % de la actividad inicial en queso se ha encontrado en muestras de 42 días de maduración (Richardson, 1981). Sin embargo, como en leche el 80% se encuentra presente como su precursor inactivo, su actividad depende del grado de activación del PLG (Farkye y Fox, 1990). La actividad detectada en el queso, resultó ser, de acuerdo a algunos autores, de 20 a 30 veces superior a la detectada en leche (Ollikainen y Nyberg, 1988). También se ha informado (Hayes y Nielsen, 2000; Fajardo-Lira et al., 1998) que aún si la PLM se encuentra inicialmente asociada con la fracción caseínica de la leche, puede ser transferida a la fracción sérica a causa del crecimiento microbiano y la producción de acidez.

Bajo condiciones favorables, la plasmina hidroliza específicamente las uniones Lys-X y en menor medida las Arg-X de las caseínas mayoritarias de la leche bovina aún cuando las que presentan una mayor susceptibilidad sean las α_2 y la β -caseínas. Fundamentalmente hidroliza la β -CN para dar los productos mayoritarios γ_1 -CN [β -CN (f29-209)] , γ_2 -CN [β -CN (f106-209)] , γ_3 -CN [β -CN (f108-209)] y en menor medida las γ_4 -CN [β -CN (f114-209)] y la γ_5 -CN [β -CN (f184-209)]. Los péptidos complementarios conocidos como los componentes de la fracción proteosa-peptona también son producidos. Éstos son PP5- [β -CN (f1-105/107)], PP8f- [β -CN (f1-28)], PP8s- [β -CN (f28-105)], PP8s'- [β -CN (f28-107)] y PPT - [β -CN (f29-113)] (McSweeney, 2004). Estas γ -CN son altamente hidrófobas como así también los productos de hidrólisis de la α_{s2} -CN.

La contribución de la PLM a la proteólisis durante el proceso de la maduración ha sido revisada por numerosos autores, Visser et al. (1979), Grappin et al. (1985) y Trujillo et al. (1993), entre otros. Senocq et al. (2002) siguieron la hidrólisis de la β -CN durante la maduración del queso Comté. Scherze et al. (1994) informaron haber encontrado mayor

proteolisis en queso Gouda elaborado con 2.5 veces más PLM. La calidad organoléptica de los quesos enriquecidos en PLM obtuvieron una calificación superior con respecto al control y la maduración fue considerada acelerada concluyendo que un nivel de 3 a 4 veces superior a la presente inicialmente en la leche, resultaría la concentración óptima. Recientemente, Somers et al. (2002) informaron un efecto adverso en la funcionalidad del queso mozzarella en elaboraciones con la adición de plasmina. Esto condujo a mayor actividad (dos y tres veces) de PLM en el queso y una mayor proteolisis de la beta-caseína asociada durante la maduración. En un trabajo similar, elaborando quesos con leches enriquecidas en PLM, Farkye y Fox, (1992) no detectaron amargor en ninguno de los quesos correspondientes a dicho estudio .

La enzima y su zimógeno son termoestables, resisten la temperatura y tiempo de pasteurización de la leche y se encuentran potencialmente activos en distintas variedades de quesos. Su actividad parece estar directamente influenciada por el tratamiento térmico de la leche de partida (Benfeldt et al., 1997). Como fue observado por Noomen (1975) Richardson y Pierce (1981) (1983) y Ollikainen y Nyberg (1988), entre otros autores, la actividad de la PLM en leche es más alta después de la pasteurización. Estos autores observaron que la pasteurización a 75 °C durante 15 segundos, incrementaba significativamente la actividad proteolítica de la plasmina, mientras la pasteurización de baja (63 °C, 30 minutos), conducía a un incremento menor.

Somers y Kelly (1992) informan que Kaminogawa et al (1972) mostraron que la inactivación total de la enzima se alcanzaba con un calentamiento a 80 °C durante 10 minutos. Adicionalmente fue observado que la temperatura de inactivación resultó superior a 67.5 °C cuando ésta se encuentra en la leche o en una solución de caseína (Metwalli et al., 1998; Lu y Nielsen, 1993; Lawrence et al., 1987; Grufferty y Fox, 1988, Somers y Kelly, 2002). Richardson (1983) explicó este efecto por la posible inactivación del inhibidor del activador del plasminógeno después de la pasteurización. Según Verdi y Barbano (1991) las condiciones antes mencionadas, podrían inactivar el activador que proviene de las células somáticas y cuya concentración se incrementa en los procesos de infección mastítica.

En lo que se refiere a su dependencia con el pH, Farkye y Fox (1990) observaron que entre pH 4.8 y 6.6 la PLM permanece asociada a las micelas de caseína y su actividad no se ve

disminuida. Sin embargo cuando el pH desciende a 4.6 la mayor parte de su actividad se ve disociada de las micelas. Crudden y Kelly (2003) observaron que la plasmina puede liberarse a pH mayores de 5.0, mientras el plasminógeno puede hacerlo gradualmente en un rango de pH de 6.6-4.6. Por lo antes mencionado, pareciera que las diferencias en la actividad de PLM dependerían principalmente del cambio de pH durante la maduración más que del desuerado. Su actividad también se ve estimulada por bajas concentraciones de NaCl en la fase acuosa del queso, pero se ve reducida por concentraciones de 2.5 M (Gufferty y Fox, 1988).

Algunos autores han observado diferencias de actividad en leches de distintas especies (Fantuz, F. et al., 2003), procedencia (Bugaud et al., 2001) y período de lactancia y edad de la vaca (Politis et al., 1989) y en distintas variedades o tipos de quesos. Richardson y Pearce (1981) observaron que el queso tipo suizo contenía el doble de actividad de PLM que el Cheddar. Farkye y Fox (1990), y Fernández et al. (2005) también demostraron una variación significativa en la actividad de la PLM entre distintas variedades de quesos. Dupont et al. (1998a) encontraron valores de concentración mayores en el Emmenthal, Blaney, Romano, Comté y Beaufort, y menores en el Brie, Cantal y Gouda y aún menores en el Cheddar, Chesire y quesos tipo Boursin. Más recientemente, algunos autores sugirieron que la actividad de PLM en la cuajada y la masa se incrementaban cuando se aumenta la temperatura de cocción de los quesos sugiriendo que existe una estimulación de la activación del PLG (Somers et al., 2002). Por el contrario, Lau et al. (1991), encontraron que la proteólisis era menor en quesos Cheddar elaborados con leche calentada a 63 °C durante 30 minutos que en los quesos tradicionales y Benfeldt et al.(1997) también informaron un descenso de la actividad de la PLM en el queso Danbo a medida que la temperatura y tiempo de mantenimiento fueron incrementadas.

Gufferty y Fox (1988) sugieren que las diferencias pueden deberse a las distintas velocidades de activación del PLG en los quesos Cheddar y tipo suizo relacionados con las condiciones de elaboración y maduración. También Hayes et al. (2000) observaron que las proteasas bacterianas y las condiciones de manufactura pueden influenciar la disrupción de las micelas de caseína y causar la liberación de distintas concentraciones de PLM en el suero. Este efecto fue anteriormente mencionado por Muset y Dupont (2000). Los autores observaron que la retención del par PLM-PLG aumentaba cuando la temperatura de cocción se incrementaba de 32 a 45 °C para un mismo tipo de queso, pero disminuía

drásticamente cuando la temperatura de cocción se elevaba a 50 °C asociados con el cambio de fermentos mesófilos a termófilos. Ésto indica que las proteasas bacterianas y las condiciones de elaboración, son factores que influyen en el nivel de PLM asociado a la fracción caseínica.

Se han expuesto distintas teorías para explicar los mecanismos que intervienen en la retención del par enzimático y la diferencia de actividad de PLM en la cuajada y su relación con el tratamiento térmico al cual fue sometida. El incremento de actividad de PLM en quesos de tipo suizo, podría explicarse debido a que el inhibidor de la PLM y el inhibidor del Activador de la Plasmina son inactivados a temperaturas de elaboración mayores y probablemente transferidos al suero. Por otro lado, la inactivación térmica del sistema activador del PLG y las interacciones inducidas térmicamente entre los componentes de los sistemas activadores de la PLM (PA), y la β -Lg (beta- lactoglobulina) con la consecuente formación de complejos tiol-disulfuro, resultan en una actividad de PLM reducida en el queso durante el período de maduración (Bastian et al, 1993; Politis et al, 1993).

El estado del arte nos permite obtener información sobre la actividad de la plasmina y la derivada del plasminógeno en distintos modelos experimentales. Se dispone, sin embargo, de escasa bibliografía sobre la concentración del par PLM/PLG, así como de los factores que intervienen en la retención y modificación de su estructura. Esto último, conjuntamente con la complejidad del sistema proteolítico relacionado con la enzima nativa contribuye a que no esté aún esclarecido la contribución del mismo en la transformación de la leche en queso y los factores que intervienen en su variación durante el proceso de la maduración.

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta la información antes expuesta, y el interés por ampliar el conocimiento relacionado con el comportamiento del par Plasmina/Plasminógeno durante la elaboración y su contribución a la maduración de los quesos elaborados de acuerdo a protocolos industriales, se propusieron los siguientes objetivos para el presente trabajo:

1.- Estudiar el efecto de la temperatura de cocción de la cuajada en la retención del par PLM/PLG, en términos de su concentración así como de la actividad de la enzima y la derivada de su precursor, y su impacto en la proteólisis durante la maduración de los quesos. Para ello, se elaboraron y evaluaron quesos con distintas temperaturas de trabajo en tina, empleando condiciones similares para los quesos tratados entre 32 a 45 °C, y de 50 y 55 °C respectivamente: *Ensayo 1*.

2.- Estudiar el efecto del tiempo de mantenimiento de la temperatura de cocción de la cuajada, en la retención del par PLM/PLG, así como la actividad de la plasmina y derivada de su precursor, el plasminógeno, en la proteólisis primaria durante la maduración de los quesos. Para ello, se elaboraron y evaluaron quesos a 42 y 54 °C respectivamente, manteniendo tiempos de cocción de 20 y 40 minutos para cada temperatura: *Ensayo 2*.

3.- Estudiar el efecto de la tecnología de elaboración de distintas variedades de quesos en la retención del par PLM/PLG y en la actividad de la plasmina y la derivada de su precursor, el plasminógeno, en la proteólisis primaria durante la maduración de los quesos. Para ello, se elaboraron y evaluaron quesos de cuatro variedades tales como: queso blanco untable, tipo Camembert, tipo Saint paulin y tipo Comté: *Ensayo 3*.

4.- Evaluar la contribución del par PLM/PLG y de la quimosina presente en el coagulante a la proteólisis en las distintas etapas de la elaboración y maduración. Con este propósito, se estudiaron muestras de leche, cuajada durante el lirado, cuajada posterior al tratamiento térmico durante el desuerado, queso joven y madurado de las cuatro variedades estudiadas en el Ensayo 3: *Ensayo 4*.

5.- Evaluar la posibilidad de caracterizar las distintas variedades de quesos y de los tratamientos que sufrieron en tina a través de los parámetros elegidos para el seguimiento de su composición y proteólisis. Para ello, se realizó el estudio estadístico de Análisis de Componentes Principales (ACP) para la totalidad de los quesos jóvenes y madurados.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Elaboración de los quesos:

Los quesos de cada ensayo, fueron elaborados durante días sucesivos en la planta piloto semiautomatizada de la Estación Experimental del INRA, Institut National de la Recherche Agronomique, Poligny, Francia. La planta piloto consta de 4 (cuatro) mini-tinas de 12 L cada una. El plan de experimentación fue concebido de forma tal de elaborar replicados de elaboraciones de igual temperatura de cocción, tiempos de mantenimiento y tecnología cada día.

La leche cruda materia prima fue remitida por un tambo cercano a la planta piloto donde fueron elaborados los quesos. Ésta fue estandarizada antes de la manufactura de los mismos con una relación final grasa a proteína igual a uno (1) y pasteurizada a 72 °C durante 15 segundos.

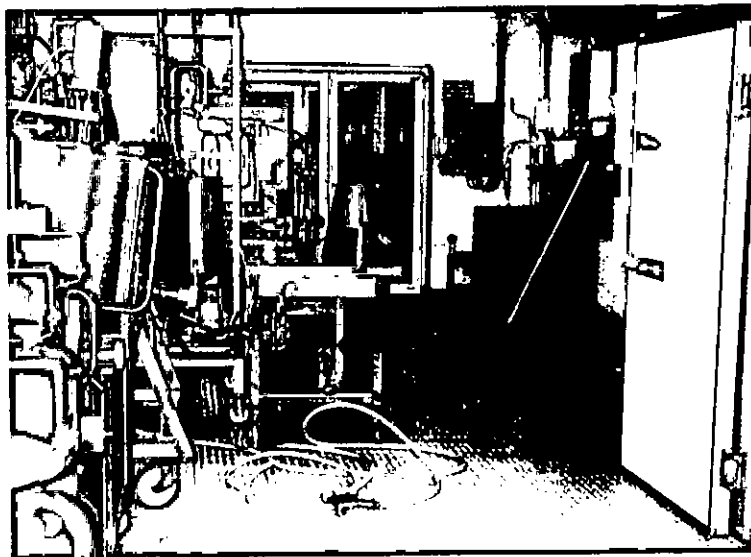


Figura 2
Imagen de la planta piloto semiautomatizada de la estación experimental en Poligny, Francia.
Distribución del equipamiento.

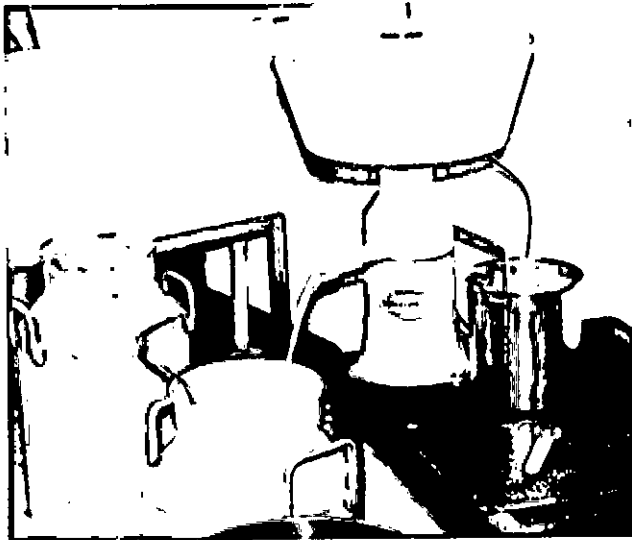


Figura 3
Imagen de la desnatadora Elecrem.
Proceso de estandarización de la leche.

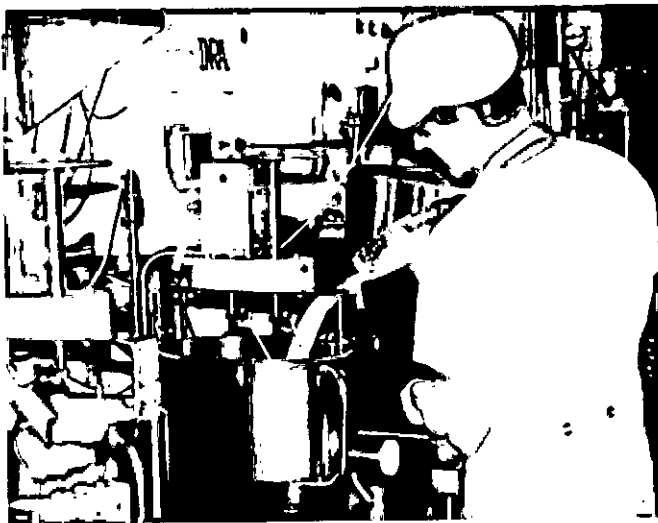


Figura 4
Imagen de la planta piloto
semiautomatizada de la estación
experimental en Poligny, Francia.
Llenado de la tina quesera.

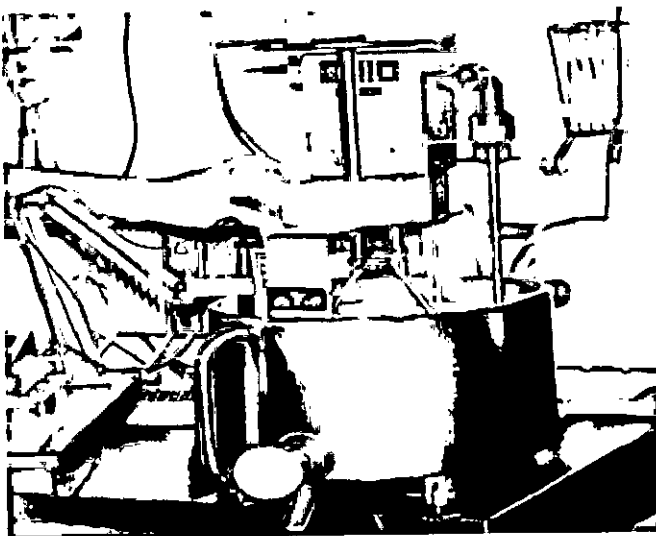


Figura 5
Detalle de una de las cuatro tinas
queseras de 12 litros de capacidad.
Sensores de conductividad y pH dentro
de la tina.
Proceso de adición del coagulante.

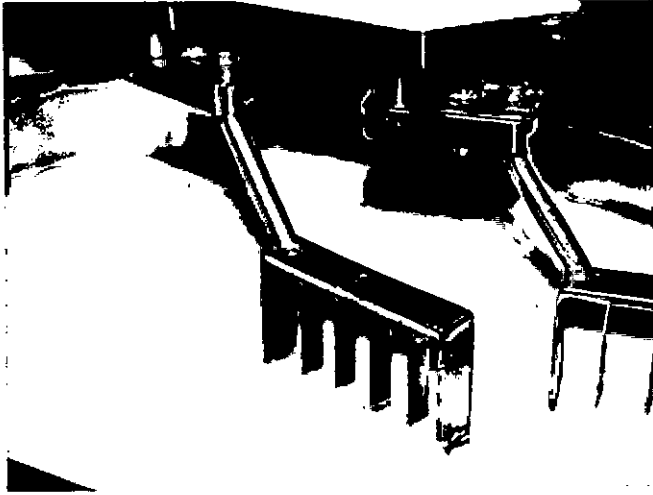


Figura 6

Detalle de las liras y de la textura y tamaño del grano.

Proceso de lirado de la cuajada.

Los quesos elaborados en las mismas condiciones y con la misma materia prima, presentaron las mismas características por lo que fueron asumidos como duplicados. Los procedimientos utilizados para la elaboración fueron elegidos de acuerdo a los protocolos utilizados en la industria láctea. Se elaboraron quesos prensados de: a) pasta semidura, mediana humedad y masa cocida (50, 54 y 55 °C) del tipo Comté, b) pasta semidura, mediana humedad y masa semi-cocidos (40, y 45 °C) del tipo MiniFynbo, Tilsit y Danbo, c) pasta semidura, mediana humedad y masa semi-cocidos (42 °C) del tipo Pategras y Gouda, d) pasta blanda, alta humedad y masa no cocida (32 y 36 °C) del tipo Saint Paulin y Por Salut, e) queso tipo blanco untable y f) queso con maduración en superficie tipo Camembert.

Los quesos de pasta no cocida, semi-cocida y cocida prensada elaborados presentaron un peso de alrededor de 1 kg cada uno y luego de un período de prensa a lo largo de la noche y de salado en salmuera, fueron cubiertos con parafina colorada mientras que los quesos tipo Camembert pesaron alrededor de 250g c/u. En todos los casos, los quesos fueron madurados en cámaras de temperatura y humedad controladas (higrometría de 95%).

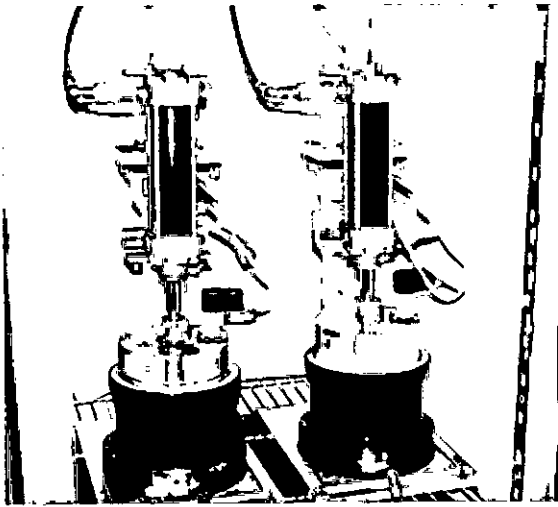


Figura 7
Prensas hidráulicas con presión controlada automáticamente, dentro de la cámara de temperatura y humedad controladas.
Proceso de prensado de los quesos.

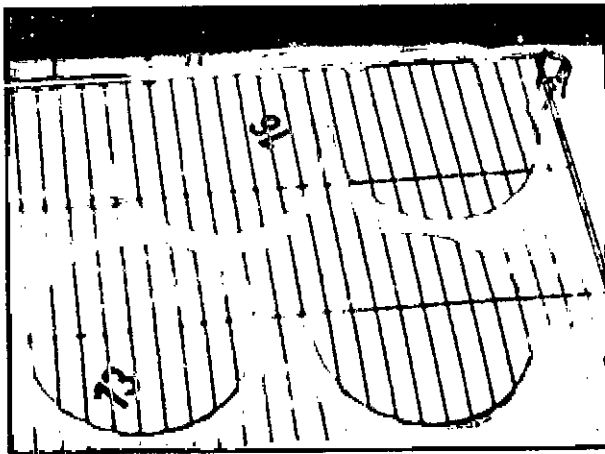


Figura 8
Inmersión de los quesos en salmuera después de la etapa de prensado. Puede observarse la identificación utilizando marcación de caseína.
Proceso de salado de los quesos.



Figura 9
Encerado de los quesos, después de la inmersión en solución de salmuera, de acuerdo al protocolo experimental.
Proceso de terminación de superficie.

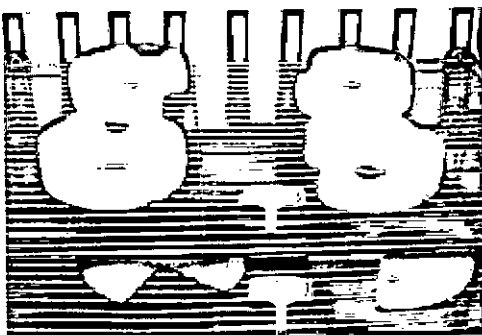


Figura 10
Quesos encerados en cámaras de temperatura y humedad controladas.
Proceso de maduración de los quesos.

3.1.1. Quesos de pasta prensada, prensada semi-cocida y prensada cocida: *Ensayo 1*.

Durante la primer etapa del estudio (*Ensayo 1*), se estudió el efecto de la temperatura de trabajo en tina en la retención y actividad del par PLM/PLG en queso y suero y se evaluó su contribución a la proteólisis ocurrida durante la maduración. Se elaboraron 12 quesos a partir de leche estandarizada y pasteurizada manteniendo temperaturas de trabajo en tina de 32 y 36 °C, (no cocidos tipo Saint Paulin), temperaturas de cocción de 40 y 45 °C, (semicocidos tipo MiniFynbo) y 50 y 55 °C, (cocidos tipo Comté). Los protocolos y el seguimiento de algunos parámetros de elaboración se presentan en el Anexo 1, Fichas técnicas 1 a) y b), 2 a) y b) y 3 a) y b) respectivamente, y las condiciones generales se resumen en la TABLA I.

TABLA I
(*Ensayo 1*)

TABLA I: Condiciones de elaboración de quesos

Temperatura de cocción en tina °C	Elaboración				Maduración		
	Starter tipo	Unidades	Coagulante mg	pH desuerado	Salado hs	Temperatura °C	días
ENSAYO							
1							
32	1	0.24	1.92	6.75	2.00	12	45
36	1	0.24	1.92	6.70	2.00	12	45
40	1	0.40	2.08	6.64	2.00	12	45
45	1	0.40	2.08	6.59	2.00	12	45
50	2a + 2b	0.125/0.062	1.68	6.60	2.50	12, 15, 21 y 4	75
55	2a + 2b	0.125/0.062	1.68	6.54	2.50	12, 15, 21 y 4	75

donde : 1. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

2a. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

2b. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*
Lactobacillus helveticus

3.1.2. Quesos de pasta prensada semi-cocida y prensada cocida: *Ensayo 2*.

La **segunda etapa**, *Ensayo 2*, consistió en la evaluación del efecto del tiempo de mantenimiento del proceso de cocción en la retención y actividad del par PLM/PLG y su contribución a la proteólisis durante el proceso de maduración de los quesos. Se elaboraron 8 (ocho) quesos a temperaturas seleccionadas de 42 y 54 °C por ser éstas representativas de quesos tipo pategras y Gouda y pasta cocida prensada tipo Comté respectivamente, con tiempos de mantenimiento de 20 y 40 minutos para cada una de estas temperaturas. Los protocolos y seguimiento de los parámetros de elaboración pueden verse en el **Anexo 1, Fichas 4a) y 4b) y 3a) y 5** respectivamente, y las condiciones generales se resumen en la **TABLA II**.

TABLA II
(*Ensayo 2*)

TABLA II: Condiciones de elaboración de quesos

Temperatura de cocción en tina °C	Elaboración				Maduración		
	Starter tipo	Unidades	Coagulante mg	pH desuerado	Salado hs	Temperatura °C	días
ENSAYO 2							
Temp °C/tiempo min							
42/ 40	1	0.35	2.00	6.57	2.0	12	45
42/ 20	1	0.35	2.00	6.56	2.0	12	45
Temp °C/ tiempo min							
54/ 40	2a+ 2b	0.125/0.062	1.76	6.52	2.5	12, 15, 21 y 4	75
54/ 20	2a+ 2b	0.125/0.062	1.76	6.53	2.5	12, 15, 21 y 4	75

donde : 1. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

2a. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

2b. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*
Lactobacillus helveticus

3.1.3. Quesos crema untable, de pasta “mole” prensada, de pasta prensada y pasta prensada cocida: Ensayo 3.

La **tercera etapa** del estudio, **Ensayo 3**, se orientó a la evaluación del efecto de la tecnología de elaboración en la retención y actividad del par PLM/PLG y su contribución a la proteólisis ocurrida durante el período de maduración de los quesos. Se elaboraron 8 quesos de 4 variedades distintas, siendo éstas: queso blanco untable, queso con maduración en superficie tipo Camembert, queso semiduro de pasta prensada tipo Saint Paulin o Por Salut y queso de pasta prensada cocida tipo Comté. Los protocolos de elaboración pueden verse en el **Anexo 1, Fichas 6, 7, 1a y 3a** respectivamente. El seguimiento de la misma para las cuatro variedades puede verse en el **Anexo 1, Ficha 8**. Las condiciones de maduración, así como los fermentos y coagulantes utilizados se resumen en la **TABLA III**.

TABLA III
(Ensayo 3)

TABLA III: Condiciones de elaboración de quesos

Variedad	Elaboración			Maduración			
	Starter	Coagulante	pH	Salado	Temperatur	días	
	Tipo	mg	desuerado	hs	a		
		Unidades			°C		
ENSAYO 3							
Queso untable	1	0.48	1.44	-	0	4	6
Camembert	1 + 3a + 3b	0.22/0.03/ 0.06	2.32	6.35	1.0	12	12
Saint paulin	1	0.24	1.92	6.70	2.0	12	45
Comté	2a + 2b	0.125 / 0.062	1.76	6.55	2.5	12, 15, 21 y 4	75

Donde: 1. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

2a. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

2b. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*
Lactobacillus helveticus

3a. *Klyveromices lactis*

3b. *Penicillum camemberti*

3.1.4. Muestreo en distintas etapas de elaboración y maduración: *Ensayo 4.*

La cuarta etapa del estudio, *Ensayo 4*, se realizó con el fin de evaluar la contribución del par PLM/PLG a la proteólisis en las distintas etapas de la elaboración y maduración. También fue evaluada la contribución de la quimosina y pepsina presentes en el coagulante. Con este propósito, se tomaron muestras de leche, cuajada durante el lirado, cuajada posterior al tratamiento térmico durante el desuerado y suero a lo largo de la elaboración y de queso joven y madurado de las cuatro variedades estudiadas en el Ensayo 3.

3.2. Análisis de los quesos

El muestreo de los quesos recién elaborados se realizó después de su inmersión en la salmuera, antes del encerado, alrededor de 20 hs después de la elaboración (denominados “jóvenes”) y al final del período de maduración (denominados “madurados”) que correspondió a 45 y 75 días para los quesos de pasta prensada y pasta prensada cocida respectivamente. Las determinaciones de pH y extracto seco fueron realizadas inmediatamente después del muestreo. Para el resto de los parámetros estudiados, las muestras fueron preparadas (ralladas, homogeneizadas y pesadas) y congeladas a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su análisis posterior.

Los quesos jóvenes recién elaborados fueron analizadas determinando pH, extracto seco, nitrógeno total (NT) y soluble (NS), concentración de PLM y PLG y actividad de PLM y derivada del PLG, mientras que en los quesos madurados se adicionaron a los anteriores las determinaciones de cloruro de sodio (NaCl) y contenido de materia grasa. Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por duplicado en cada queso.

3.2.1. Estudio de la composición de los quesos

3.2.1.1. Determinación de pH

Para la medición del pH, la muestra de queso fue rallada, cargada en un recipiente de la forma y dimensiones similares a un dedal plástico donde se introdujo el electrodo de vidrio. Se utilizó un pHmetro marca ORION.

3.2.1.2. Determinación de Extracto Seco total (ES)

El extracto seco fue, en todos los casos, el primer ensayo que se realizó y fue determinado según la Norma IDF 4A: 1982.

Se utilizaron cápsulas metálicas descartables, que fueron sometidas a 102 ± 1 °C en estufa durante la noche con agregado de arena lavada. Las mismas fueron retiradas de la estufa y equilibradas en desecador por 1 hora. Una vez pesadas las cápsulas con la arena, se agregaron y pesaron con una precisión de 0.1 mg alrededor de 1.5 g de muestra de queso previamente rallado y se mezcló con la arena ayudándose con una varilla de vidrio que fue introducida en la estufa junto con las cápsulas. Una vez transcurrido un tiempo de 20 horas en la estufa, se colocaron nuevamente en el desecador 1 hora y se pesaron con una precisión de 0.1 mg. El cálculo se realizó por diferencia y se expresó como % p/p.

3.2.1.3. Determinación de Nitrógeno Total (NT) y Nitrógeno soluble (NS)

La determinación de nitrógeno total y soluble se llevó a cabo de acuerdo al método semiautomatizado de Kjeldahl que implicó una mineralización, destilación y titulación de las muestras de queso previamente tratadas (Collomb et al. 1990). Los resultados fueron expresados en % del extracto seco.

Para el dosaje de NT se pesaron en papel libre de nitrógeno, entre 0.18 y 0.20 g (± 0.1 mg) de queso previamente rallado, y se congelaron hasta su análisis [ISO: 8968-2-IDF 20-2: 2001 (E)]. Esto se realizó por triplicado. Para el dosaje de NS, se pesaron aproximadamente 10 g (al 0.1 mg) de queso rallado en un erlenmeyer de 200 ml, se dispersaron con 100 ml de buffer citrato 0.5 M pH 7.00 con la ayuda de un homogeneizador Ultra Turrax (IKA, Alemania) durante 3 min y se termizaron en baño de agua a 40 °C durante 15 min (Gripon et al., 1975). Después de agitación durante 30 min con agitador magnético a temperatura ambiente y cuando el queso se encontró completamente disperso, el pH fue ajustado a 4.4 con ácido clorhídrico 4N. Se dejó descansar la suspensión durante 30 min a temperatura ambiente sin agitación y finalmente se centrifugó a 1200 g durante 15 min a 4 °C. Se quitó la capa de grasa formada en la superficie y se tomó una alícuota de 10 ml del sobrenadante previamente filtrado (papel de 8µm de retención) para determinar el contenido de nitrógeno. La extracción se realizó por duplicado por muestra y el contenido de nitrógeno se determinó por duplicado en cada extracto.

3.2.1.4. Determinación de materia grasa

El contenido de materia grasa fue determinado utilizando el método butirométrico de Van Gulik (ISO 3433: 1975). Se pesaron exactamente entre 2.990 y 3.010 g de queso rallado en

un dedal especial que fue introducido en el butirómetro. Luego se adicionaron 10 ml de una solución 50:50 de ácido perclórico 60% y ácido acético glacial, y se colocaron en baño de agua a 85 °C durante 10 minutos. Después de la disolución completa del queso, se dejaron durante 30 minutos más en el baño a 85 °C, se homogeneizaron suavemente y centrifugaron a 1200 g durante 12 minutos, colocándolos posteriormente en un baño a 65 °C durante por lo menos 15 minutos después de lo cual se tomó la lectura según la escala. El resultado fue expresado como g /100 g de queso o g/100 g de ES.

3.2.1.5. Determinación de cloruro de sodio

El contenido de NaCl fue determinado por medio de un electrodo específico de plata de acuerdo a la Norma IDF 88A: 1988.-

3.2.2. Determinación de la concentración de plasmina y plasminógeno en las muestras de queso.

3.2.6.1. Preparación de la muestra

a) queso: después de rallar 20 g de queso, se pesó una porción de 3 g en un recipiente y se suspendió en 20 ml de buffer citrato trisódico (CTS) 0.4 M pH 8.3, conduciendo a un volumen final de 22.5 ml. La suspensión fue homogeneizada utilizando un Ultra-Turrax (IKA, Alemania) sobre un baño de hielo, durante 1 min primero y en Stomacher (Stomacher 400, Lab-Blender, Londres) durante 5 minutos después. Una alícuota de 10 ml de las muestras así preparadas fue incubada durante 2 hs a temperatura ambiente con 150 µl de ácido ε-amino caproico (EACA) y ultracentrifugada a 100000 g por 1 h a 4°C (Sorvall Ultra Pro 80, Du Pont Company, Newtown CT 06470, USA). Se recuperaron 3 tubos Eppendorf del sobrenadante y se congelaron a -20 °C para su análisis posterior.

b) leche y suero: en este caso, sólo se requirieron los pasos de la incubación de las muestras durante 2 hs con la solución de EACA y de la ultracentrifugación en las mismas condiciones que con el queso. El sobrenadante fue recuperado y congelado a -20 °C para su posterior análisis.

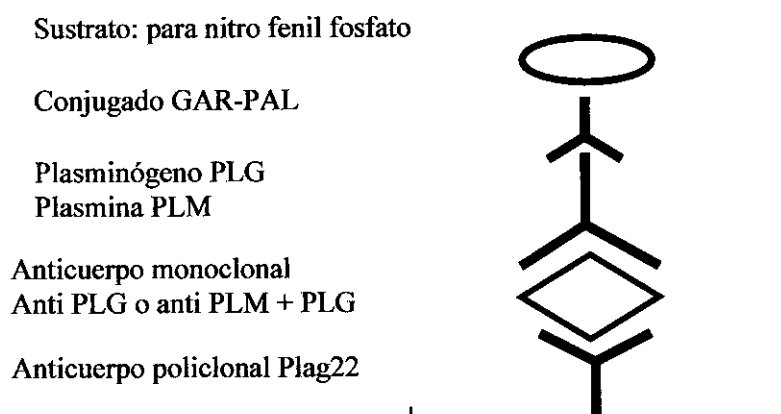
3.2.6.2. Dosaje de plasmina (PLM) y el par plasmina-plasminógeno (PLM-PLG) por el método ELISA sándwich.

El sobrenadante obtenido como se mencionó, se usó para la cuantificación de la concentración de PLM y PLG por medio de un ensayo ELISA sándwich como fuera

descrito por Dupont et al. (1998), utilizando anticuerpos monoclonales específicos reactivos contra PLG y la combinación PLM + PLG.

- 1.- Siembra de anticuerpos monoclonales: sobre las placas ELISA (NUNC Maxisorp), de acuerdo al esquema previsto, se depositaron 100 μ l del anticuerpo monoclonal para la detección de PLG y del anticuerpo monoclonal para la detección del par PLM+PLG en tampón carbonato 0.1M pH 9.6, respectivamente. Las placas se incubaron 90 min a 37 °C y posteriormente se lavaron con PBS-Tween. El PBS-T está compuesto por buffer fosfato 0.05M pH 7.2, NaCl 0.15M conteniendo 0.05 ml/l de Tween 20.
 - 2.- Saturación de las placas: las placas fueron saturadas con 100 μ l de una solución 50:50 de PBS-T y gelatina al 1%, e incubadas durante 1 hora a 37 °C, luego fueron lavadas con PBS-T.
 - 3.- Siembra del antígeno purificado (curva de calibración) y de las muestras preparadas. Se realizaron las diluciones del estándar de PLG (1mg/ml) en PBS-T de 1:20 hasta 1:100 (dependiendo del tipo de queso), y se sembraron 100 μ l por pocillo con posterior incubación a 37 °C durante 1h 30, seguidas por el lavado con PBS-T.
 - 4.- Siembra del anticuerpo policlonal Plag22. Éste fue diluido 1:200 y se sembraron 100 μ l por pocillo, siguiendo las etapas de incubación a 37 °C durante 75, y posterior lavado con PBS-T.
 - 5.- Siembra del conjugado GAR-PAL (Goat anti Rabbit-Phosphatase alkaline). Fue diluido 1:3000 en PBS-T y se sembraron 100 μ l por pocillo, siguiendo las etapas de incubación a 37 °C durante 75, y posterior lavado con PBS-T.
 - 6.- Siembra del sustrato paranitrofenil fosfato (PNPP). Se preparó disolviendo 2 pastillas de 5 mg c/u en 10 ml de buffer dietanolamina y se sembró sobre la placa que fue incubada a 37 °C hasta que la Absorbancia a 405 nm obtenida para el pocillo con la concentración de 100 ng/ml de la curva de calibración llegara a un valor de 1.8 (generalmente alrededor de los 45 minutos).
- La Absorbancia a 405 nm fue medida con un lector de placas ELISA provisto de 96 cabezales lectoras (Anthos Labtec Instruments). La concentración de PLG se determinó directamente, mientras que la concentración de PLM se obtuvo por sustracción del PLG DeL par PLG+PLM.

Esquema del principio del método ELISA sándwich



3.2.3. Determinación de las actividades de plasmina y de la derivada del plasminógeno en muestras de queso.

El método utilizado fue una modificación de la técnica publicada por Politis et al. (1989) y Bastian et al (1993). Las modificaciones aportadas en nuestro caso, nos permitieron efectuar el dosaje en placas de microtitulación de 96 pocillos (NUNC Maxisorp) en el extracto de queso preparado como se explicó anteriormente. La actividad de plasmina (PLM) derivada del plasminógeno (PLG) fue determinada después de la activación del plasminógeno por medio del agregado de una solución de urokinasa (E.C.3.4.21.31 Sigma U 5636) 15 kui/ml e incubación de la mezcla a 37°C durante 15 min utilizando la metodología propuesta inicialmente por Rollema et al (1983). El producto de reacción fue registrado espectrofotométricamente a 405 nm desde el tiempo 0 hasta las 3 hs de reacción tomando datos cada 30 min.

Las mediciones se realizaron utilizando como sustrato un péptido S2251: D-valyl-leucil L-arginina-4-nitroanilida (producto de SERVA, Boehringer) disuelto en buffer Tris-HCl. La composición final del mismo es de: Tris-HCl 160 mM pH 7.00, KCl, 40 mM; EDTA 100 Mm; EACA(ácido ε-amino caproico) 25 mM y el péptido S2251, 0.6 mM.

El esquema de la técnica utilizada es el siguiente:

- 1.- Depósito 20 µl de cada una de las muestras en dos pocillos de la placa.

2.- Agregado de 5 µl de urokinasa (SANOFI) de 15 kui/ml en el segundo pocillo de cada una de las muestras.

3.- Incubación de la placa durante 15 minutos a 37 °C. La urokinasa provoca la activación del PLG en PLM, por lo tanto en los pocillos donde fue agregada esta enzima pudimos determinar la actividad conjunta del PLG + PLM.

4.- Agregado de 200 µl del buffer Tris-HCl conteniendo KCl, EDTA, EACA y S2251. La plasmina hidroliza este sustrato sintético lo que permite la liberación de nitroanilina y conduce a la coloración amarilla.

5.- Lectura de la Absorbancia a 405 nm, por medio de un lector de placas (Anthos Labtec Instruments). Luego se realizaron iguales lecturas cada 30 minutos durante un período de 3 horas. La actividad de la PLM fue obtenida a partir de la pendiente de pocillos donde no se agregó urokinasa, y la de la PLM conjuntamente con aquélla derivada del PLG fue obtenida en los que fue agregado el activador.

6.- los resultados se expresaron en Unidades de Actividad, según el cálculo siguiente:

$\text{Absorbancia } 405 \text{ nm } (t_1) - \text{Absorbancia } 405 \text{ nm } (t_0) / (t_1 - t_0) * 1000$, donde el tiempo está medido en minutos.

3.2.4. Estudio de la proteólisis

3.2.4.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida-Urea. Urea PAGE de la fracción nitrogenada insoluble a pH 4.4

Se analizó la fracción insoluble a pH 4.4 utilizando electroforesis vertical en geles discontinuos de poliacrilamida-urea de acuerdo al protocolo descrito por Andrews (2001) y Mc Sweeney et al. (1993). Otros autores (Gaiaschi et al. 2000, 2001, Benfeldt et al. (1997), Fox y McSweeney, 1996, entre otros), han utilizado la hidrólisis de las proteínas mayoritarias de la leche y su evolución durante la maduración, como indicadores de la acción proteolítica de la plasmina, quimosina, pepsina y enzimas proteolíticas de los fermentos.

3.2.8.1.1. Preparación de la muestra

La muestra de queso se preparó de acuerdo a:

1.- disolución de la muestra de queso en un buffer citrato de sodio 0.5 M pH 7.0 como se describe para la obtención de Nitrógeno Soluble.

2.- Ajuste del pH a 4.4 con HCl 4N

3.- Centrifugación a 1200g por 15 minutos a 4°C

4.- recuperación del precipitado

5.- Liofilización de la fracción insoluble a pH 4.4

Las muestras así obtenidas fueron disueltas en una solución de buffer Tris-HCl pH 6.8 (200 μ l), urea 7M (600 μ l), β -mercapto etanol (100 μ l), glicerol (400 μ l) y azul de bromofenol al 0.05% (100 μ l) pH 7.4, para obtener una concentración de 10 mg/5 ml. Esta dilución permite la ionización de los grupos ácidos de los aminoácidos de las cadenas laterales y de otorgar a los mismos una carga neta negativa.

3.2.8.1.2. Corrida electroforética

Las proteínas, se desplazaron a velocidades diferentes en función de su tamaño y carga manteniendo el voltaje constante a 280 V y la corriente alrededor de 50 mA. Estas fueron precipitadas por una solución de ácido Tricloro acético (TCA) 12%, coloreadas con Azul de Coomassie R 250 en una mezcla etanol: ácido acético: glicerol: agua (200/50/25/725) durante una noche, finalmente decoloreadas con la misma mezcla de solventes hasta obtener un fondo transparente. El perfil de las bandas se evaluó con un densitómetro Biorad GS 670 y la superficie de cada banda se calculó utilizando el programa Molecular Analyst de Biorad. Los resultados fueron expresados en porcentaje de cada banda con respecto a 100, tomando el área de los picos como parámetro de comparación. Se evaluaron, adicionalmente, tres relaciones porcentuales de las bandas más significativas, siendo éstas: $(\alpha_{s1}/\alpha_{s1} + \alpha_{s1I}) * 100$ como indicador de la proteólisis de la $\alpha_{s1}I$ por acción de la quimosina, y $(\Sigma \gamma / \beta + \Sigma \gamma) * 100$ y $(\Sigma \gamma / \beta) * 100$ como indicadores de la proteólisis de la β -CN por acción de la plasmina.

Para contar con datos que permitieran realizar un análisis estadístico, se realizaron cuatro repeticiones de cada muestra de queso. Para ello, se preparó un plan de siembra en cada una de las placas para los Ensayos 1, 2, 3 y 4 respectivamente, de forma de correr cuadruplicados de cada fracción proteica.

3.2.4.2. Análisis por HPLC en fase reversa de la fase soluble a pH 4.4.

3.2.4.2.1. Extracción y precipitación.

Los trozos de queso fueron descongelados durante una noche a 5 °C, rallados y después de la homogeneización, se pesaron alrededor de 5g con una precisión de 0.1 mg en un erlenmeyer de 200 ml y se agregaron 100 ml de buffer citrato de sodio 0.5M pH 7.0. Se agitó con un agitador magnético, durante 15 minutos a temperatura ambiente y se colocó en baño maría a 40 °C durante otros 15 min y luego nuevamente a temperatura ambiente durante 30 minutos, de forma de obtener una disolución completa y sin partículas para

todos los tipos de quesos. Seguidamente, se ajustó el pH a 4.4 por medio de una solución de HCl 4N y se mantuvo a temperatura ambiente por lo menos durante 30 minutos sin agitar.

Después de la centrifugación (1500 g, 15 min), el sobrenadante se filtró por papel plisado Whatman 540 y finalmente fueron filtrados por acetato de celulosa 0.45 µm. El filtrado fue conservado a -30 °C en tubos Eppendorf hasta su análisis cromatográfico.

Simultáneamente con las muestras, fueron inyectados blancos de agua pura y solventes, así como una muestra testigo obtenida en el laboratorio (mezcla de péptidos solubles en agua obtenidos a partir de una muestra de queso) que permite seguir la evolución y performance de las condiciones cromatográficas y actúa como referencia.

3.2.4.2.2. Corrida cromatográfica

Las condiciones cromatográficas empleadas en todos los casos puede verse en la **Tabla IV**

Tabla IV: condiciones cromatográficas para el estudio del Nitrógeno soluble

Cromatógrafo	Varian LC5000	
Columna	Zorbax (DuPont) C18, 150 x 4.6 µm, 300 Å	
Pre-columna	Zorbax (DuPont) C18, 12.5 x 4.6 µm, 300 Å	
Volumen inyectado	50 µl	
Temperatura	37 °C	
Detección	214 nm. Detector UV 100 (Varian)	
Solventes	A	B
Tri Fluoro Acético, TFA (ml)	1.05	1
Acetonitrilo (ml)	-	600
Agua ultrapura >18Mohm (ml)	qsp 1000	qsp 1000

El gradiente utilizado para la elución es el siguiente:

Tiempo minutos	A (%)
0	100
5	100
105	0
110	0
111	100
116	100

3.3. Análisis estadístico de los resultados

3.3.1. Análisis de varianza.

Se realizó para los resultados mostrados en los Ensayos 1, 2, 3.

Se utilizó el *Análisis de Varianza* de un factor (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas para cada propiedad entre las muestras. Luego se procedió a calcular, mediante el test de Tukey, la Mínima Diferencia Significativa.

Se utilizó un α de 0.05 en todos los análisis, excepto en los casos en que se especifica otra condición.

Test de Tukey: para una propiedad dada, los promedios que se presentan con la misma letra (a, b, c, d) no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

(*) MDS: indica la mínima diferencia en valor de intensidad, para que las muestras se consideren distintas.

3.3.2. Análisis de componentes principales (ACP)

Se utilizó un programa PROC ANOVA SAS. Comparación de las medias según el método de Newman-Keuls (SAS) con un umbral de 5%.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE COCCIÓN DE LA CUAJADA EN LA RETENCIÓN DEL PAR PLM-PLG Y EN LA ACTIVIDAD DE LA PLASMINA Y LA DERIVADA DE SU PRECURSOR, EL PLASMINÓGENO EN LA PROTEOLISIS PRIMARIA DURANTE LA MADURACIÓN DE LOS QUESOS (ENSAYO 1).

4.1.1. COMPOSICIÓN MAYORITARIA DE LOS QUESOS

Los quesos de cada tipo elaborados el mismo día fueron considerados duplicados ya que la materia prima fue regular a lo largo de todas las experiencias. La composición de los quesos jóvenes salidos de salmuera previo encerado y de los madurados se resumen en la **Tabla V**.

TABLA V: *Composición físico-química de los quesos elaborados utilizando distintas temperaturas de trabajo en tina y dos tipos de tecnología. Quesos jóvenes y madurados.*

<i>quesos jóvenes (20 hs)</i>						
Temperatura a °C	pH		Extracto seco %		NT/ES	
	X	DE	X	DE	X	DE
GRUPO 1						
32	5.18 ^a	0.00	51.34 ^a	0.16	6.66 ^a	0.18
36	5.30 ^b	0.03	53.50 ^b	1.07	6.78 ^a	0.47
40	5.37 ^c	0.01	56.92 ^c	0.65	6.81 ^a	0.41
45	5.46 ^d	0.01	59.96 ^d	0.20	6.85 ^a	0.22
GRUPO 2						
50	5.32 ^b	0.01	62.49 ^e	0.32	6.88 ^a	0.35
55	5.37 ^c	0.02	63.86 ^f	0.38	6.78 ^a	0.48

Quesos madurados

Temperatura a °C	pH		Extracto seco		NaCl/ES		Grasa/ES		NT/ES	
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
GRUPO 1										
32	5.20 ^a	0.03	49.38 ^a	0.42	1.72 ^a	0.03	24.57 ^a	0.33	6.64 ^a	0.47
36	5.53 ^b	0.01	53.62 ^b	0.20	1.69 ^a	0.07	26.75 ^b	0.29	6.79 ^a	0.21
40	5.79 ^c	0.03	56.85 ^c	0.79	1.33 ^b	0.05	28.65 ^c	0.60	6.79 ^a	0.86
45	5.86 ^d	0.01	59.96 ^d	0.12	1.11 ^c	0.07	30.50 ^d	0.03	6.84 ^a	0.13
GRUPO 2										
50	5.78 ^c	0.01	62.80 ^e	0.09	0.71 ^d	0.07	31.52 ^c	0.09	6.86 ^a	0.10
55	5.62 ^c	0.01	63.86 ^f	0.01	0.69 ^d	0.02	31.80 ^e	0.35	6.84 ^a	0.04

Nota: Promedio (X) y desvío estándar (DE) de determinaciones por duplicado de cada uno de los dos quesos (n=4) elaborados en distintas tinas.

El supraíndice indica la diferencia significativa entre la comparación de las distintas temperaturas de cocción. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes (P<0.05).

Los valores de pH se incrementaron significativamente de 5.18 a 5.46 en los quesos jóvenes al aumentar la temperatura del proceso de cocción de la cuajada de 32 a 45 °C (Grupo 1). Cuando se modificó el fermento para elaborar quesos con una temperatura de cocción de la cuajada a 50 °C, (Grupo 2), el pH descendió a 5.32 y aumentó con la temperatura de cocción dentro del mismo grupo, indicando la influencia del tipo de fermentos utilizados fundamentalmente en relación con las bacterias termófilas altamente acidificantes.

Las diferencias de pH entre los quesos madurados y los jóvenes (20 hs), mostraron valores crecientes para los quesos pertenecientes al primer grupo con el aumento de la temperatura de 32 a 45 °C, y presentó el valor más alto en aquéllos que fueron sometidos a una temperatura de cocción de 50 °C.

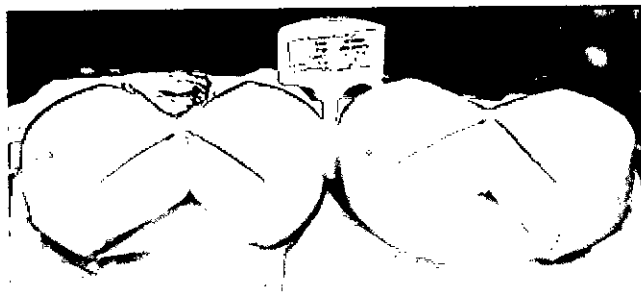
El Extracto Seco (ES) aumentó a medida que se incrementó la temperatura de cocción de la cuajada. Resultados similares publican Somers y Kelly (2002) para quesos experimentales y Wilkinson et al. (1995) y Yun et al. (1993) quienes encontraron, que el aumento de la temperatura de cocción reduce el porcentaje de humedad en quesos del tipo Cheddar y Mozzarella respectivamente. El extracto seco no se modificó a lo largo del período de maduración. Ésto era de esperarse para los quesos terminados con una cobertura de cera

(Guerrero y Muset, 1999). El contenido de grasa resultó similar y se mantuvo a lo largo del experimento independientemente de la tecnología utilizada.

En nuestro estudio, no se observaron diferencias significativas en la relación Nitrógeno total/Extracto Seco para los distintos tratamientos. Se observó una tendencia creciente de la relación con la temperatura de cocción. Somers y Kelly (2002) observaron valores de la relación mayores a medida que se incrementó la temperatura de cocción de la cuajada. Explicaron este efecto debido al hecho que las proteínas del suero pueden sufrir cambios conformacionales parciales en su estructura y coprecipitar con la caseína en la matriz de la cuajada conjuntamente con la menor pérdida de proteosa peptona en el suero debido a la inactivación térmica parcial del coagulante.

El contenido de sal (NaCl) resultó menor a medida que se trabajó a mayores temperaturas de cocción, aún cuando el tiempo de permanencia en salmuera fuera 25% mayor para los quesos tratados a 55 °C (2 y 2.5 hs respectivamente). Estos resultados concuerdan con los publicados por Somers y Kelly (2002) encontrando valores de 2.25 % y 1.73% de NaCl para quesos tratados a 43 y 55°C respectivamente. Esto puede explicarse por el coeficiente de penetración diferente debido a la variación de la firmeza de la matriz (Zorrilla y Rubiolo, 1995 y 1998; Innocenti et al., 2002). En todos los casos, la concentración de sal fue adecuada para la actividad enzimática. El pH de la salmuera se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento en un valor de 5.10.

Los quesos madurados se presentan en las **Figuras 11 a 13**



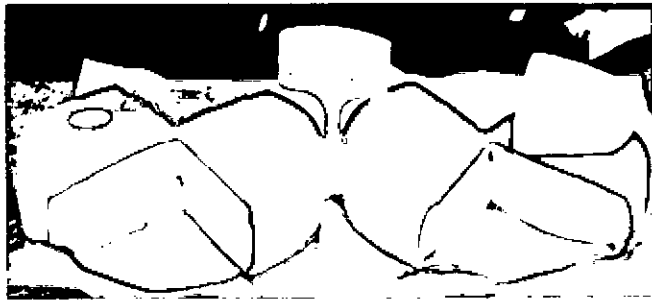


Figura 11. Quesos de pasta prensada no cocida elaborados a 32 °C y 36 °C correspondientes a la tecnología de queso Saint Paulin.

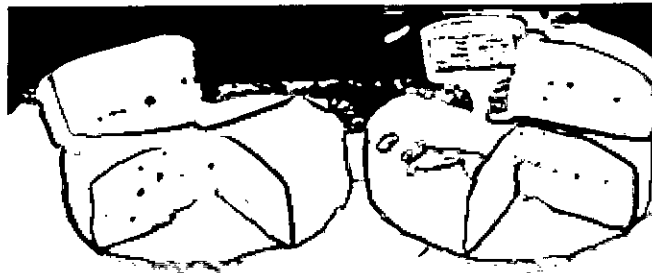


Figura 12. Quesos de pasta prensada semi-cocida elaborados a 40 °C y 45 °C correspondientes a la tecnología de quesos MiniFynbo.

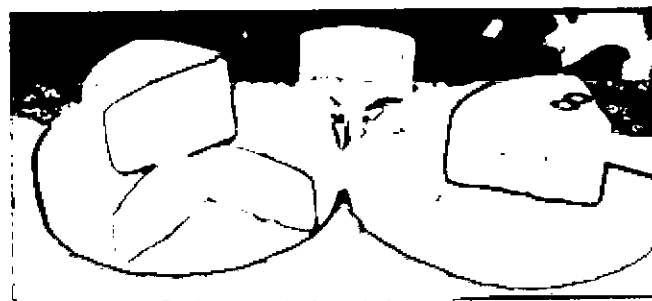


Figura 13. Quesos de pasta prensada cocida elaborados a 50 °C y 55 °C correspondientes a la tecnología del queso Comté.

4.1.2. RETENCIÓN DEL PAR PLASMINA/ PLASMINÓGENO

CONCENTRACIÓN DE PLASMINA Y PLASMINÓGENO EN QUESO Y SUERO

Las concentraciones de la enzima Plasmina (PLM) y de su precursor Plasminógeno (PLG) en queso y suero, así como la concentración de la enzima nativa presente en la leche utilizada como materia prima, se resumen en la **Tabla VI**. Con el fin de poder comparar y eliminar la variable de la humedad de la masa, los resultados se expresaron en µg de PLM, PLG o del par PLM + PLG con respecto al extracto seco.

TABLA VI: Determinación de las concentraciones totales de PLG y PLG + PLM por el método ELISA, en quesos jóvenes de 20 h y el respectivo suero en el desuerado, utilizando distintas temperaturas de trabajo en tina y fermentos.

Temperatura °C	QUESO						SUERO					
	PLG		PLG + PLM		PLM	%	PLG		PLG + PLM		PLM	%
	ug/g ES						ug/ml					
X	DE	X	DE			X	DE	X	DE			
GRUPO 1												
32	23.06 ^c	1.12	29.22 ^c	0.97	6.16 ^b	21.1	0.39 ^a	0.12	0.49 ^a	0.06	0.10 ^a	20.4
36	21.08 ^c	1.10	28.41 ^c	0.73	7.33 ^b	25.8	0.40 ^a	0.10	0.51 ^a	0.06	0.11 ^a	21.6
40	19.24 ^b	1.48	27.06 ^c	0.73	7.82 ^c	28.9	0.39 ^a	0.10	0.54 ^a	0.07	0.15 ^a	27.8
45	19.55 ^b	1.59	28.24 ^c	1.00	8.69 ^c	30.8	0.40 ^a	0.08	0.56 ^a	0.08	0.16 ^a	28.6
GRUPO 2												
50	6.19 ^a	0.03	12.00 ^a	0.58	5.81 ^a	48.4	0.49 ^a	0.17	0.60 ^a	0.18	0.11 ^a	17.8
55	4.95 ^a	1.08	15.00 ^b	0.38	10.05 ^d	67.0	0.45 ^a	0.11	0.45 ^a	0.10	0.00 ^a	17.4
Leche (ug/ml)	1.43	0.08	1.93	0.16	0.50	25.9						

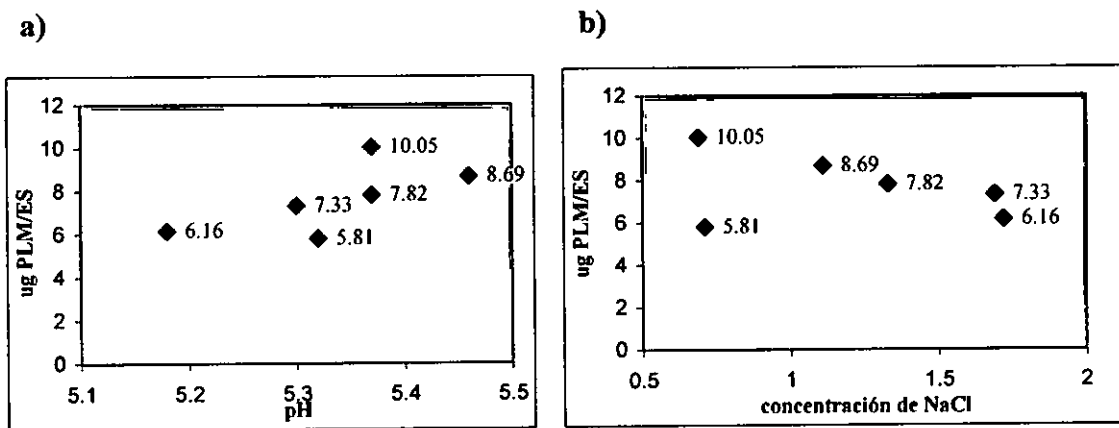
Nota: Los datos informados corresponden a n=6 determinaciones para cada parámetro. El supraíndice indica la diferencia significativa entre la comparación de las distintas temperaturas de cocción. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes (P<0.05).

Se obtuvo un valor de 1.93 µg/ml PLM + PLG (0.50 µg/ml PLM) para la leche pasteurizada utilizada como materia prima durante los días de elaboración del Ensayo 1. Este valor medio está de acuerdo con los informados anteriormente por otros autores como Bastian y Brown (1996) y Dupont et al. (1998). Si consideramos un rendimiento promedio del 10% para la obtención de los distintos tipos de quesos y si un 100% del par plasmina/plasminógeno se recuperara en la cuajada, esperaríamos alrededor de 19 µg/g en el queso. El par (PLM + PLG) fue preferentemente retenido en cuajadas tratadas a temperaturas entre 32 °C y 45 °C presentando valores promedio de 15.6 µg/g en queso (valores no mostrados) correspondiendo a valores de 28.23 µg/g expresado en base seca para independizarse del contenido de humedad de las distintas variedades. Estos valores concuerdan con los resultados publicados por Mulvihill (1993) de 15 µg/g de plasmina en

cuajadas tratadas a 32 °C, mostrando resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo para condiciones similares.

La relación de la concentración de plasmina en la masa del queso joven con el pH y el contenido en NaCl pueden verse en la **Figura 14 a y b**.

Figura 14 a) y b): a) relación de la concentración de PLM con el pH y b) con el contenido en NaCl en el queso.



Observamos que a valores de pH crecientes, la retención de PLM también presenta una tendencia creciente. Cuando estudiamos quesos con contenido de NaCl crecientes, la concentración de la PLM no presenta una tendencia definida. Podemos concluir que el rango de contenido salino de los quesos estudiados, no influye en la retención del par enzimático.

Con respecto a la retención del par enzimático, cuando en la elaboración de quesos de pasta prensada cocida a 50 y 55 °C utilizamos un fermento diferente compuesto por dos tipos de *starters* adicionados en forma sucesiva de acuerdo al protocolo, respetando un período de premaduración y manteniendo constantes la calidad de la materia prima y las condiciones de coagulación, se observó una disminución drástica del 58 % en la concentración del complejo enzimático retenido en la cuajada de los quesos sometidos a este tratamiento (Tabla VI, Grupo 2).

Ante la ocurrencia reiterada de la disminución de la concentración del par enzimático retenido en la cuajada de los quesos tratados con estos fermentos, fue necesario confirmar

que el extracto utilizado para el dosaje de la enzima y de su zimógeno era el adecuado. Con el objetivo de verificar ésto y siguiendo el protocolo de análisis, se determinó por el método ELISA, la concentración del par PLM/PLG en el precipitado y en el sobrenadante de una muestra preparada después del tratamiento con EACA. Los resultados obtenidos pueden verse en la **Tabla VII**.

Tabla VII: *Porcentaje de la concentración de PLG y la del par PLM + PLG retenido en el precipitado del extracto obtenido, según la metodología de extracción utilizada.*

Quesos	PLG (ug/g queso)			PLG + PLM (ug/g queso)		
	Extracto	Precipitado	(%)	Extracto	Precipitado	(%)
1	2.06	0.04	2	5.03	0.1	3
2	8.66	0.11	1.2	17.02	0.4	2.3
3	15.46	0.24	1.5	23.36	0.44	1.8
4	5.4	0.05	0.9	8.74	0.13	1.5

Los resultados obtenidos muestran que ambos compuestos, PLM y PLG, se detectaron mayoritariamente en el sobrenadante, fracción a partir de la cual se tomaron las alícuotas para la realización de todos los ensayos. En el precipitado, fracción descartada después de la ultracentrifugación, la concentración detectada fue despreciable. Esto confirma los resultados encontrados para las muestras de quesos del Grupo 2.

A pesar del descenso de las concentraciones de PLM y PLG en la cuajada de los quesos tratados a 50 y 55 °C, el queso que presentó la concentración más alta de plasmina retenida en la cuajada resultó aquél tratado a 55 °C. Adicionalmente, el tratamiento de cocción provocó la activación del PLG en PLM y se observó que el porcentaje de PLM en el complejo PLM + PLG aumentó de 21.1% a 67% independientemente de los fermentos utilizados (Tabla VI). Resultados concordantes fueron antes observados por Dupont et al. (1998) quienes encontraron que los quesos semiduros de pasta semi-cocida prensada (Grupo 1), estaban caracterizados por un mayor contenido en PLG que los quesos de pasta cocida prensada que hubieran sufrido un tratamiento de cocción a temperaturas mayores. Éstos mostraron niveles iguales o mayores de PLM que de PLG sugiriendo que el cambio

conformacional del PLG ocurrió durante la etapa de elaboración ya que la concentración relativa de la plasmina en el queso se incrementó en comparación con la de la leche. Una observación destacable es que el aumento de la temperatura de cocción conlleva a una transformación del PLG en PLM independientemente de otros factores (Tabla VI, % PLM)

En el presente trabajo, no hemos detectado variaciones significativas de la concentración de PLG ni del par PLM/PLG en el suero de los quesos tratados a distintas temperaturas. En este caso se encontró un porcentaje de PLM que varió entre 20.4% en el suero correspondiente a quesos no cocidos (32 °C, Grupo 1) y 17.6 % en promedio en el suero proveniente de quesos cocidos (50 y 55 °C, Grupo 2). La concentración encontrada en el suero fue en todos los casos inferior a la encontrada en leche o en queso, debiéndose ésto a la incorporación eficiente del par PLM/PLG en la cuajada causada por su unión con las micelas caseínicas. Este efecto fue mencionado anteriormente por Farkye y Fox (1992). Estos autores observaron que, aún cuando fueran agregadas altas concentraciones de PLM a quesos experimentales, no se encontraba una actividad concomitante en el suero. Crudden y Kelly (2003) también informaron que el suero obtenido por adición de coagulante a leche pasteurizada, presentó actividades de PLM y derivada del PLG significativamente inferiores ($P < 0.001$) que las de la cuajada. Estos autores observaron que la transferencia de la PLM al suero, aumentaba en forma lineal con la temperatura de cocción en el rango de 45 a 65 °C.

En el Grupo 2, en el cual la cuajada fue tratada a 50 y 55 °C, la diferencia entre las relaciones porcentuales de PLM con respecto al total encontrados en suero y queso fue muy marcada con valores de 17.4 y 67.0 % de PLM respectivamente para el queso tratado a 55 °C (Tabla VI). Una hipótesis que permitiría explicar estos resultados es que la transformación del PLG en PLM se produce cuando el queso está en el molde y durante las etapas posteriores de prensado y salado. Otra podría relacionarse con la retención preferencial de la PLM con respecto a su zimógeno, el PLG. En las citas antes mencionadas, no fue estudiado el suero ni los quesos durante los pasos experimentales, por lo cual no se puede reforzar esta hipótesis con resultados observados por otros autores.

Para tener más elementos que pudieran fortalecer esta teoría, se llevó adelante una elaboración de quesos de pasta prensada cocida tipo Comté tomando muestras en distintas etapas del proceso de elaboración y maduración desde la leche inicial hasta el queso a los 4

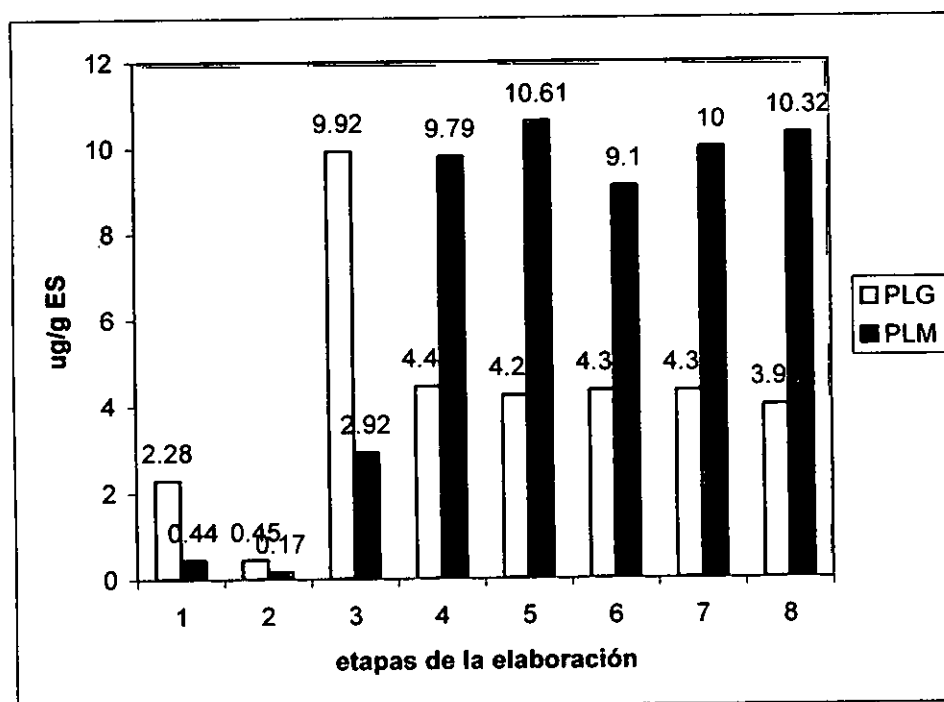
meses de maduración, para determinar la evolución del cambio conformacional de PLG en PLM. Los resultados obtenidos, pueden verse en la **Tabla VIII** y la **Figura 14**.

TABLA VIII: Determinación ELISA de la concentración total de PLG + PLM y la concentración de PLG prensada cocida durante distintas etapas de la elaboración de un queso de pasta

Etapas	PLG		PLM		PLM %
	<i>X</i>	<i>DE</i>	<i>X</i>	<i>DE</i>	
Leche ($\mu\text{g/ml}$)	2.28	0.21	0.44	0.08	16
Suero en desuerado ($\mu\text{g/ml}$)	0.45	0.09	0.17	0.02	27
Cuajada ($\mu\text{g/g}$ cuajada)	9.92	0.44	2.92	0.12	23
Queso joven ($\mu\text{g/g}$ queso)	4.44	0.25	9.79	1.10	69
Queso 3 semanas ($\mu\text{g/g}$ queso)	4.23	0.15	10.61	0.04	72
Queso 7.5 semanas ($\mu\text{g/g}$ queso)	4.34	0.57	9.10	0.75	67
Queso 3 meses ($\mu\text{g/g}$ queso)	4.33	0.51	10.00	1.17	70
Queso 4 meses ($\mu\text{g/g}$ queso)	3.99	0.43	10.32	0.05	72

Nota: Los datos informados corresponden a n=4 determinaciones.

Figura 15: concentración del par PLM/PLG durante distintos pasos en la elaboración de un queso de pasta prensada cocida.



donde; 1 y 2, leche y suero en el desuerado respectivamente (ug/ml)
 3: cuajada durante el desuerado expresado en ug/g de cuajada
 4, 5, 6, 7 y 8: queso joven de 20 hs, quesos a 3 y 7.5 semanas y 3 y 4 meses respectivamente expresado en ug/g de queso.

Estos datos son orientativos, y se expresan como la concentración de la PLM y el PLG en el extracto seco de cada una de las muestras extraídas en distintas etapas de la elaboración. En este caso la comparación se realizó dentro de la misma variedad y el objetivo fue evaluar si se producía una activación del PLG a PLM en el queso.

De la evaluación de los resultados, se observa que esta activación de la PLM ocurre durante la etapa de moldeo, prensado o salado ya que el queso joven presenta un 69% que se mantiene relativamente constante durante el período de maduración en valores cercanos a 70%, mientras que la cuajada presenta un 28% y el suero un 27%.

Se evaluó la distribución del complejo PLM/PLG en la totalidad del queso y suero. Los resultados que se muestran en la **Tabla IX**, corresponden a la sumatoria de las concentraciones de PLM y PLG en la masa total de los quesos jóvenes salidos de salmuera (20 hs posterior a su elaboración) y a la correspondiente al volumen total del suero durante el desuerado.

TABLA IX: *determinación de la concentración total del sistema enzimático de PLG + PLM por el método ELISA considerando el peso de los quesos y el volumen del suero durante el desuerado.*

Temperatura °C	Peso del queso (g)		PLG + PLM (mg)				Recuperación (%)	
	X	DE	Queso		Suero			
GRUPO 1								
32	1330 ^a	11	19.95	0.60	4.18	0.63	24.13	104
36	1221 ^a	7	18.56	0.48	4.34	0.63	22.90	99
40	1140 ^b	4	17.56	0.47	4.66	0.74	22.22	95
45	1075 ^c	4	18.20	0.64	5.26	0.86	23.46	96
GRUPO 2								
50	999 ^d	6	7.49	0.36	6.38	0.90	13.87	60
55	989 ^d	10	9.48	0.24	4.80	0.95	14.28	62
Leche							23.18	

Nota: los datos consignados en la tabla son promedios de 6 (n=6) mediciones realizadas sobre dos quesos correspondientes a cada tipo o característica.

El supraíndice indica la diferencia significativa entre la comparación de las distintas temperaturas de cocción. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

El complejo PLM y PLG, asociado a la matriz caseínica, fue retenido mayoritariamente en la cuajada con recuperaciones de 98.5% en promedio para el Grupo 1.

Como fuera demostrado con anterioridad por Dupont et al. (1998), la concentración total del par PLM/PLG permaneció invariable en los quesos correspondientes al Grupo 1 con valores cercanos a 23.18 mg en promedio en el queso joven salido de salmuera. Sin embargo, observamos que la concentración total de PLM + PLG varió de acuerdo a las condiciones de elaboración utilizadas y presentó una disminución brusca no esperada en los valores del par retenido en la cuajada y liberado en el suero cuando pasamos de 45 a 50 °C presentando en el último caso, un valor promedio de 14.08 mg. Ésto representó una reducción del 39 %, marcando nuevamente la tendencia de un cambio drástico en ese punto.

Fajardo-Lira et al. (2000) observaron que en presencia de bacterias psicrótrofas, sus proteasas exocelulares son capaces de liberar la PLM y el PLG de la cuajada hacia el suero durante las 5 primeras horas de fabricación incluyendo las etapas de prensado y salado. En el presente estudio, para los quesos tratados a 50 y 55 °C, se utilizaron *starters* acidificantes de bacterias termófilas en dos pasos sucesivos. Si bien se observó una reducción en la retención del par, no se observó un incremento significativo en la concentración de PLM/PLG presente en el suero. Adicionalmente, Guinot-Thomas et al. (1995), observaron que, durante el estacionamiento de leche a 4 °C durante 6 días y habiendo alcanzado un recuento de psicrotrofas de 10^6 a 10^7 ufc, no se produjo una activación del PLG por acción de los activadores naturales ni microbianos y que las actividades de la PLM y del par PLM/PLG decrecieron durante los 6 días de almacenamiento a 4 °C.

4.1.3. ACTIVIDAD DE PLASMINA Y DERIVADA DEL PLG EN QUESO

Las actividades correspondientes a la plasmina y a la derivada del plasminógeno, también fueron estudiadas. Los resultados obtenidos para los quesos jóvenes y madurados pueden verse en la **Tabla X**.

Tabla X: *determinación de la actividad de la PLM, la derivada del PLG y la relación porcentual de PLM con respecto al par PLM/PLG [(actPLM/actPLM + act. derivada del PLG) * 100], en quesos jóvenes de 20 hs y quesos madurados.*

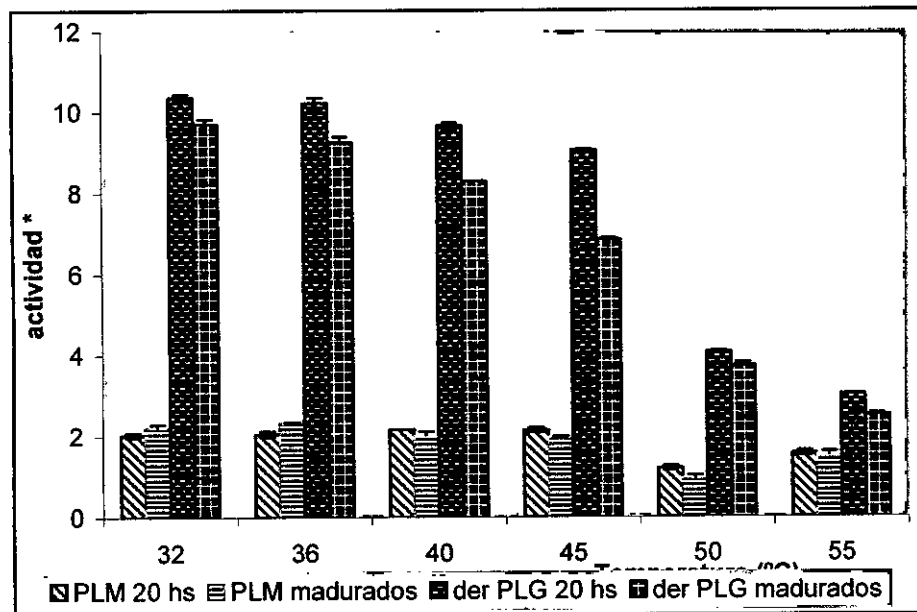
Temperatura a °C	actividad PLM/ES*		actividad derivada del PLG/ES*		PLM (%)	actividad PLM/ES*		actividad derivada del PLG/ES*		PLM (%)
	<i>quesos jóvenes</i>					<i>quesos madurados</i>				
	X	DE	X	DE		X	X	DE	X	
Grupo 1										
32	2.034 ^a	0.051	10.368 ^a	0.076	16.40	2.218 ^a	0.074	9.714 ^a	0.118	18.60
36	2.052 ^{ab}	0.070	10.228 ^a	0.140	16.71	2.342 ^a	0.016	9.260 ^b	0.141	20.19
40	2.171 ^b	0.001	9.670 ^b	0.072	18.33	2.034 ^b	0.084	8.294 ^c	0.004	19.69
45	2.150 ^{ab}	0.055	9.054 ^c	0.037	19.19	1.984 ^b	0.006	6.856 ^d	0.025	22.45
Grupo 2										
50	1.207 ^c	0.058	4.082 ^d	0.029	22.82	0.970 ^c	0.057	3.735 ^e	0.085	20.62
55	1.572 ^d	0.059	3.033 ^e	0.012	34.14	1.532 ^d	0.078	2.511 ^f	0.043	37.89

* la actividad de la PLM y aquella derivada del PLG se expresan en unidades enzimáticas según la siguiente fórmula: $\text{Abs } 405 \text{ nm } (t_1) - \text{Abs } 405 \text{ nm } (t_0) / (t_1 - t_0) \times 1000$, donde el tiempo está medido en minutos.

El supraíndice indica la diferencia significativa entre la comparación de las distintas temperaturas de cocción. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Con el fin de facilitar la comparación de los resultados, los mismos fueron representados en la **Figura 16**.

FIGURA 16: *actividad de PLM y derivada del PLG en quesos jóvenes de 20 hs y madurados, de acuerdo al método de detección espectrofotométrica.*



La actividad de plasmina en leche resultó ser similar a lo largo de todo el experimento, (0.60 unidades/l). Este resultado está de acuerdo con los valores antes presentados para leche proveniente de vacas Holstein por Bastian et al. (1993), y con los resultados presentados por Bastian y Brown (1996) y Dupont et al (1998).

La actividad del sistema enzimático PLM/PLG fue estudiada en la masa para las distintas elaboraciones de quesos. La temperatura de cocción en tina, afectó débilmente la actividad residual para los quesos jóvenes del Grupo 1. A medida que la temperatura de cocción fue incrementada, la actividad de la PLM mostró una tendencia creciente, pero la actividad total de PLG + PLM mostró una tendencia opuesta ya que decreció de 12.21 a 11.20 unidades para los quesos jóvenes tratados a 32 °C y 45 °C respectivamente. Una caída pronunciada fue observada cuando se variaron los fermentos y la temperatura de cocción pasó de 45 a 50 °C, mostrando que menos del 50% de la actividad del par fue retenida en los quesos jóvenes.

El porcentaje de actividad de PLM con respecto a la actividad total calculada como sumatoria de la de la PLM y la derivada del PLG, aumentó con la temperatura de cocción independientemente del tipo de fermento empleado y estuvo siempre por debajo del 50%. Esta observación indica la potencialidad que tiene el PLG residual de transformarse en su forma activa, la PLM. Estos resultados concuerdan con la tendencia creciente informada previamente para el porcentaje de las concentraciones de PLM determinado por el método

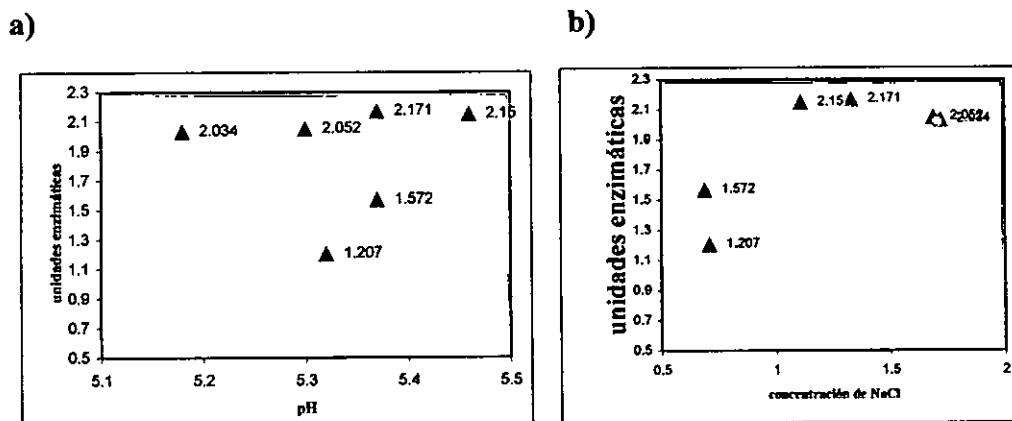
ELISA (Tabla VI). Sin embargo, comparando ambos resultados, se observa que los porcentajes de la actividad de la enzima presenta valores inferiores que los de concentración para un mismo queso. Así, para aquéllos tratados a 32 °C, se observan valores de 18.6 y 40.13% respectivamente y para los tratados a 55 °C los valores observados fueron de 21.1 y 67 % respectivamente. Estos resultados indican menor actividad porcentual que la concentración presente en la cuajada. Este efecto puede ser explicado por una sub-estimación de la actividad debida a la inhibición de la misma causada por la β -Lg y otras proteínas del lactosuero o bien por el hecho que no toda la enzima presente pueda expresar su actividad.

La activación porcentual de la PLM, continuó a lo largo del período de maduración como puede observarse en los resultados mostrados para la actividad de PLM y derivada del PLG en quesos madurados. La contribución de la PLM a la actividad total aumentó en todos los casos (promedio de 2.81%) con excepción del queso tratado a 50 °C en el que descendió el 2.2%. Tendencias crecientes fueron igualmente observadas por Song et al (1993) y Somers y Kelly, (2002) quienes estudiaron la actividad del par PLM/PLG durante la maduración.

Por el contrario, los valores absolutos correspondientes a la actividad de PLM en los distintos ensayos disminuyeron a lo largo de la maduración (con excepción de los quesos tratados a 32 y 36 °C en los cuales la actividad de PLM aumentó débilmente durante este período). Otros autores observaron este efecto como por ejemplo para el queso Begrkase elaborado con leche cruda en el cual el contenido de la PLM disminuyó durante la maduración de 0.83 a 0.73 unidades (Ginzinger et al. 1999) y el contenido de PLG también decreció. Song et al (1993) y Ollikainien et al (1988) observaron que el nivel de actividad de PLM disminuía gradualmente a lo largo del período de 1 a 20 días de maduración y luego se mantenía constante en ese valor hasta el final de la maduración. Bastian et al (1997) también observaron una disminución de la actividad total de PLM durante la maduración de un queso tipo Suizo donde se habían utilizado *S. thermophilus* y *L. Helveticus* como fermentos. Por el contrario, Somers y Kelly (2002) y Fernández et al. (2005) encontraron actividades de PLM crecientes (en valor absoluto) con temperaturas de cocción en tina también crecientes.

La relación de la actividad de plasmina en la masa del queso joven con el pH y el contenido en NaCl pueden verse en la **Figura 17 a y b**.

Figura 17 a) y b): a) relación de la actividad de PLM con el pH y b) con el contenido en NaCl en el queso.



Observamos que a valores de pH crecientes, la actividad de la enzima en la masa también presenta una tendencia creciente, aunque no tan definida como en el caso de la concentración. Adicionalmente, el caso del contenido de NaCl no mostró mucha variación para los quesos del Grupo 1. En el caso del grupo 2, a valores crecientes de NaCl, se observó una tendencia decreciente en actividad de la plasmina. Sin embargo, el conjunto de los quesos presentó resultados variables y pareció verse más afectado por los fermentos utilizados que el caso de la retención expresada en función de la concentración (Figura 14).

4.1.4. INDICADORES DE LA PROTEOLISIS

4.1.4.1. EVALUACIÓN DEL NITRÓGENO SOLUBLE

Por medio de la precipitación diferenciada de las proteínas de la masa casearia, es posible individualizar péptidos de alto peso molecular, de bajo peso molecular y aminoácidos libres. La presencia de estos compuestos, es un indicador del proceso de hidrólisis de las proteínas de la cuajada que conducen al proceso de maduración del queso, que será finalmente responsable de la textura y sabor de los mismos.

El análisis del proceso proteolítico ha sido clásicamente estudiado refiriéndose a la cantidad de Nitrógeno Soluble como una proporción del Nitrógeno Total y definida como “Índice de Maduración”.

Los resultados obtenidos para la relación Nitrógeno soluble/ Nitrógeno total se muestran en la **Tabla XI**.

TABLA XI: nitrógeno soluble a pH 4.4 como porcentaje (%) del Nitrógeno total en quesos jóvenes (20 hs) y madurados y la diferencia entre ambos.

Temperatura °C	maduración días	NS/NT x 100				diferencia
		quesos jóvenes (20 hs)		quesos madurados		
		X	DE	X	DE	
GRUPO 1						
32	45	5.14 ^a	0.02	19.88 ^a	0.04	14.7
36	45	4.66 ^b	0.10	16.61 ^b	0.03	12.0
40	45	4.31 ^c	0.06	16.43 ^c	0.07	12.1
45	45	3.70 ^d	0.03	14.20 ^d	0.02	10.5
GRUPO 2						
50	70	3.49 ^e	0.03	16.11 ^e	0.02	12.6
55	70	4.43 ^c	0.11	16.26 ^f	0.06	11.8

Nota: Promedio (*X*) y desvío estándar (*DE*) de n=6 determinaciones realizadas por triplicado en muestras de cada una de los dos quesos elaborados en distintas tinas.

El supraíndice indica la diferencia significativa entre la comparación de las distintas temperaturas de cocción. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

El valor máximo de la relación porcentual de Nitrógeno soluble con respecto al Nitrógeno total, considerado como el Índice de Maduración (Im) (Salvadori del Prato, 1998), fue observado para los quesos no cocidos (32°C) madurados y decrecieron significativamente a medida que se incrementó la temperatura de cocción en el Grupo 1. Esto puede explicarse por la reducción de la actividad de la quimosina a medida que aumenta la temperatura del trabajo en tina. Los quesos madurados del Grupo 2, mostraron un incremento significativo cuando aumentamos en 5 °C la temperatura de cocción. En este caso, el factor predominante es la proteólisis causada por la plasmina, ya que el nivel de inactivación de la quimosina es similar en ambos casos.

La formación de Nitrógeno soluble a lo largo del período de maduración, fue estimada por la diferencia entre los valores de Nitrógeno Soluble porcentual obtenidos para los quesos madurados y jóvenes respectivamente. Esta diferencia fue menor en los quesos que sufrieron la cocción a mayor temperatura dentro de cada grupo, 45 °C (Grupo 1) y 55 °C (Grupo 2).

El incremento de la relación porcentual NS/NT durante la maduración resultó de 14.7 a 10.5 en el Grupo 1 y 12.6 a 11.8 en el Grupo 2. Estos rangos están de acuerdo con los

referidos para quesos semiduros con valores informados por Salvadori del Prato (1998) menores o iguales a 18, para quesos comerciales tipo Gruyere de Comté a 1.5 meses de maduración (Collin et al 1987) y similares a los quesos madurados tipo Bergkase (Ginzinger et al., 1999) y el Cheddar (Kelly, 1999). Difieren, sin embargo, de los resultados obtenidos para quesos tipo miniGouda experimentales madurados a 5 °C con el fin de obtener una proteólisis relativamente baja (Muset y Guerrero, 1999) donde se observaron diferencias de sólo 1.9 a 2.3 para quesos encerados y envasados al vacío respectivamente. Los resultados obtenidos en el ensayo presente indican una contribución importante de los agentes proteolíticos durante la maduración.

En la bibliografía se han informado resultados diversos y no siempre coincidentes relacionados con la evolución del Nitrógeno Soluble (NS) durante la maduración al aumentar la actividad de la plasmina. Bastian, et al. (1997) mostraron que al aumentar la actividad de la PLM mediante el agregado de la enzima a mezclas experimentales, se producía una hidrólisis de la β -CN acelerada presentando un aumento del NS durante los 12 meses de maduración. Resultados coincidentes han presentado Upadhyay et al. (2004) quienes estimularon la activación del plasminógeno mediante el agregado de estreptoquinasa (produciendo quesos con 3 veces la actividad de plasmina con respecto a los controles) y obtuvieron un incremento en el Nsoluble a pH 4.6 así como una hidrólisis acelerada de la β -CN. Por otro lado, Farkye y Fox (1992) observaron que el aumento de la actividad de PLM en el queso no implicaba directamente un aumento en el contenido de Nitrógeno soluble o del Nitrógeno soluble en agua del queso, pero que alteraba el perfil peptídico de dicha fracción durante la maduración. En el presente trabajo, la actividad de plasmina del Grupo 2, es significativamente inferior a la del Grupo 1, y sin embargo el incremento de la relación porcentual NS/NT es similar a la de los quesos pertenecientes a este Grupo.

4.1.4.2. DEGRADACIÓN DE LA FRACCIÓN CASEÍNICA

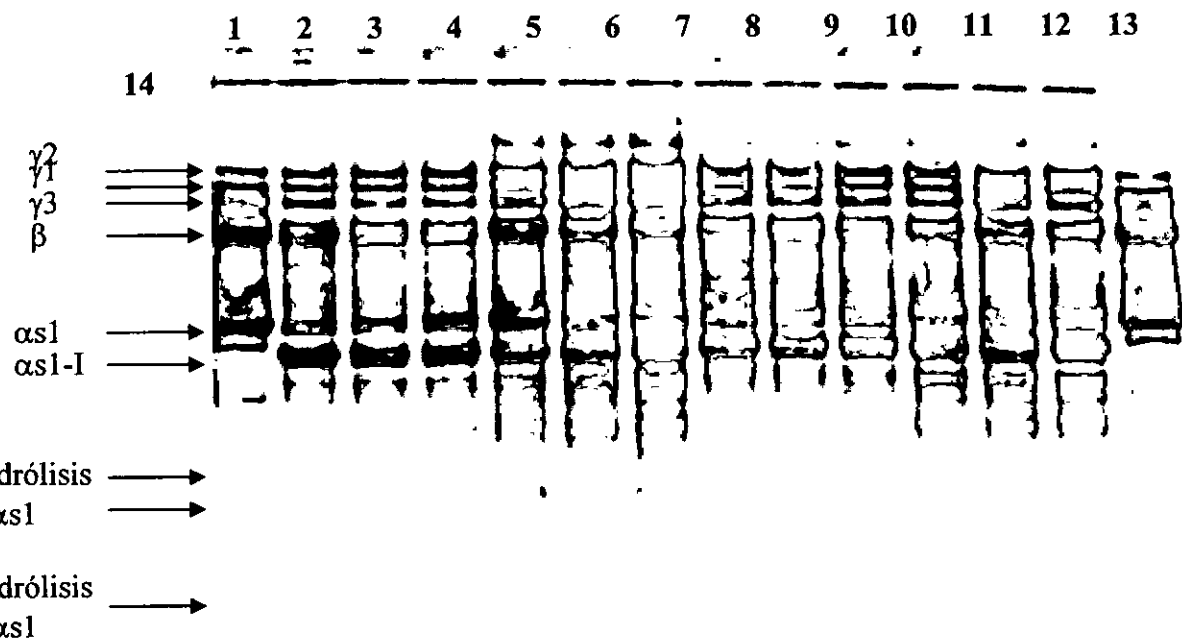
El progreso de la proteólisis en la mayoría de los quesos madurados, se puede resumir de la siguiente manera: la hidrólisis inicial de las caseínas es catalizada principalmente por el coagulante residual y en menor medida por la plasmina, dando como resultado la formación de péptidos de tamaño grande e intermedio que serán posteriormente degradados por las enzimas provenientes del coagulante y de la flora correspondiente al

starter y no starter. Esta etapa es conocida como la proteólisis primaria. La producción posterior de péptidos pequeños y aminoácidos libres como resultado de la acción de proteasas y peptidasas bacterianas corresponde a la proteólisis secundaria.

Se evaluó el efecto de la actividad de la plasmina en la proteólisis primaria de la caseína durante la maduración de los quesos elaborados a distintas temperaturas de trabajo en tina y distintos fermentos de acuerdo a la tecnología en uso. La metodología utilizada para evaluarlo, fue la electroforesis en geles verticales de poliacrilamida-urea, y los quesos fueron analizados al final del período de maduración.

En la **Figura 18**, puede verse la separación electroforética correspondiente a las fracciones caseínicas de los quesos sometidos a distintas temperaturas de cocción y trabajo en tina.

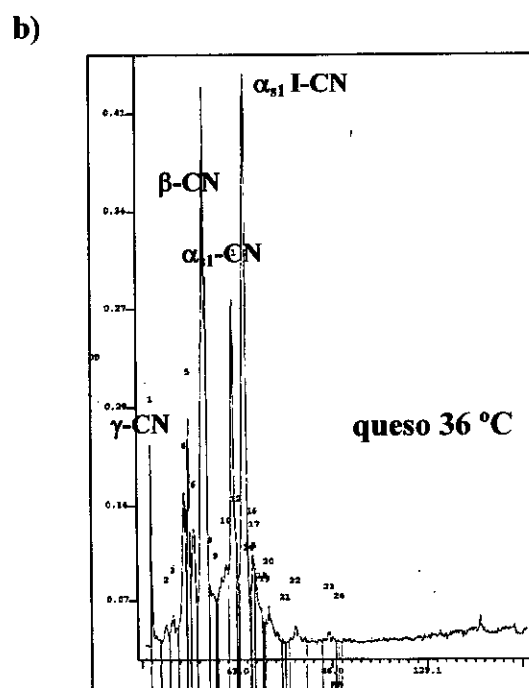
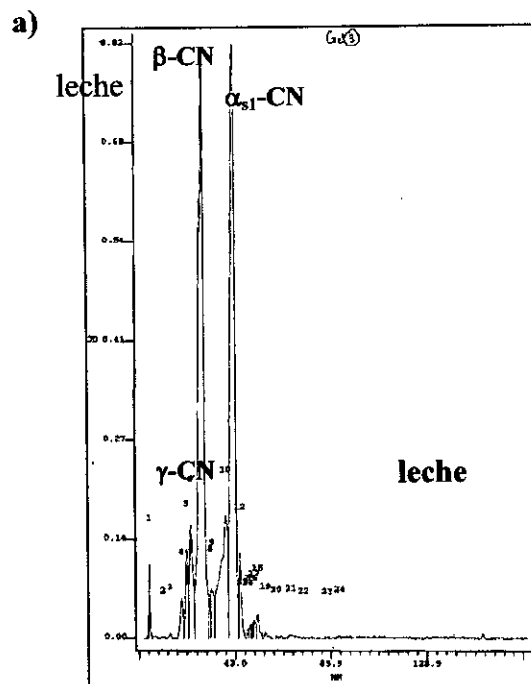
Figura 18: Urea-PAGE (12% T, 4% C) de los quesos elaborados según el protocolo correspondiente y con distintas temperaturas de cocción en tina. *Calles 1 y 14:* leche de partida, *calles 2 y 8:* quesos no cocidos a 32 °C, *calles 3 y 9:* quesos con calentamiento a 36 °C, *calles 4 y 10:* quesos con cocción 40 °C, *calles 5 y 11:* quesos con cocción a 45 °C, *calles 6 y 12:* quesos de pasta cocida a 50 °C y *calles 7 y 13:* quesos de pasta cocida a 55 °C a fines de los respectivos tiempos de maduración.



Ensayo 1: diferentes temperaturas de cocción. Quesos madurados

Registros representativos que muestran la designación de los picos considerados para la estimación de la proteólisis, pueden verse en la **Figura 19**.

Figura 19: electroforetogramas, pertenecientes al gel presentado en la Figura 11. Los registros pertenecen a la fracción insoluble a pH 4.4 de: a) leche, b) queso elaborado a temperatura de cocción de 36 °C .



Las áreas relativas de los picos correspondientes a las distintas fracciones caseínicas y relaciones indicadoras de la proteólisis, pueden verse en la **Tabla XII**.

Tabla XII: áreas relativas de los picos correspondientes a las distintas fracciones caseínicas y las siguientes relaciones como indicadores de la proteólisis: $(\alpha_{s1I} / \alpha_{s1} + \alpha_{s1I}) \times 100$, $(\sum \gamma / \beta + \sum \gamma) \times 100$ y $(\sum \gamma / \beta) \times 100$, de los quesos tratados a 32, 36, 40, 45, 50 y 55 °C, de acuerdo a la lectura densitométrica de las bandas obtenidas.

		GRUPO 1								GRUPO 2				
Picos	Leche		32 °C		36 °C		40 °C		45 °C		50 °C		55 °C	
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
1	0.88	0.12	2.98	0.14	2.44	0.03	2.45	0.17	2.62	0.09	2.46	0.17	2.52	0.16
2	0.26	0.02	0.86	0.13	0.73	0.03	0.93	0.15	0.78	0.57	1.05	0.34	1.10	0.37
3	0.48	0.04	1.46	0.31	1.30	0.16	1.53	0.72	1.89	0.91	1.93	0.54	2.72	0.45
4 γ_2 -CN	1.77	0.08	4.13 ^a	0.01	5.87 ^b	0.02	5.74 ^b	0.31	5.91 ^b	0.60	6.72 ^c	0.79	8.11 ^d	0.27
5 γ_1 -CN	2.67	0.02	3.88 ^a	0.03	4.72 ^b	0.09	4.75 ^b	0.29	4.28 ^a	0.28	5.45 ^c	0.05	5.42 ^c	0.41
6 γ_3 -CN	4.63	0.20	3.43 ⁿ	0.25	4.02 ^{ab}	0.27	4.13 ^b	0.13	3.81 ^{ab}	0.32	4.97 ^c	0.17	5.10 ^c	0.72
7 β -CN	36.08	0.33	28.02 ^a	0.33	25.68 ^b	0.44	24.05 ^c	1.33	23.27 ^{cd}	0.65	22.33 ^d	0.98	19.94 ^c	0.88
8	1.07	0.11	3.93	0.88	3.25	0.44	2.80	0.40	1.26	0.25	1.30	0.15	1.24	0.17
9	2.41	0.02	1.50	0.64	0.97	0.24	0.85	0.07	0.52	0.17	0.67	0.28	0.29	0.04
10 α_{s2} -CN	10.70	0.58	9.33	0.47	6.65	0.24	6.38	0.44	7.61	0.44	6.99	0.99	6.15	0.28
11 α_{s1} -CN	32.46	0.30	7.49 ^a	0.16	8.30 ^a	0.35	12.26 ^b	0.01	19.71 ^c	1.30	15.96 ^b	0.44	16.60 ^d	1.47
12	2.43	0.14	0.84	0.10	0.75	0.14	0.87	0.33	1.74	0.02	1.30	0.19	1.55	0.08
13 α_{s1} I-CN	0.30	0.05	22.52 ^a	0.55	24.46 ^b	0.07	21.90 ^a	0.92	14.53 ^c	1.66	16.82 ^d	1.03	15.16 ^c	1.18
14	0.30	0.13	0.23	0.05	0.30	0.03	0.30	0.04	0.44	0.13	0.47	0.13	0.27	0.06
15	0.80	0.44	0.60	0.44	0.46	0.17	0.56	0.17	0.35	0.20	0.42	0.00	0.35	0.01
16 prod hid	0.32	0.11	1.40	0.45	2.30	0.14	2.06	0.08	1.72	0.23	2.18	0.24	2.12	0.06
17 prod hid	0.43	0.01	2.61	1.01	2.57	0.18	2.35	0.15	3.13	0.36	3.80	0.53	3.36	0.32
18	0.76	0.03	0.49	0.05	0.22	0.07	0.77	0.29	0.76	0.27	0.65	0.13	1.49	0.05
19	0.74	0.45	0.30	0.15	0.21	0.09	0.27	0.10	0.30	0.12	0.24	0.08	2.22	0.02
20 prod hid	0.04	0.01	2.64	0.24	2.46	0.66	2.65	0.72	3.49	0.71	3.53	0.65	4.57	0.60
21	0.40	0.02	0.04	0.02	0.05	0.01	0.09	0.05	1.33	0.14	1.02	0.02	1.06	0.40
22	0.03	0.00	0.53	0.14	0.95	0.11	1.36	0.10	0.08	0.00	0.06	0.01	0.08	0.03
23 prod hid	0.04	0.00	0.84	0.03	1.25	0.06	0.88	0.01	0.10	0.03	0.07	0.02	0.09	0.00
24 prod hid	0.04	0.01	0.07	0.02	0.11	0.04	0.04	0.01	0.40	0.07	0.37	0.02	0.56	0.07
Relaciones														
$(\alpha_{s1}I/\alpha_{s1} + \alpha_{s1}I) \times 100$	0.9	0.1	75.0 ^a	1.6	74.7 ^a	3.1	64.1 ^b	2.7	42.4 ^c	2.8	48.7 ^c	3.0	47.7 ^c	4.2
$(\Sigma \gamma / \beta + \Sigma \gamma) \times 100$	2.0	0.1	28.9 ^a	2.1	36.3 ^b	2.4	37.8 ^b	2.0	37.6 ^b	2.8	43.4 ^c	3.1	48.3 ^c	3.0
$(\Sigma \gamma / \beta) \times 100$	25*	1.1	40.8 ^a	2.9	56.9 ^b	3.8	60.8 ^b	3.2	60.2 ^b	4.5	76.4 ^c	4.9	93.4 ^d	5.6

* la κ -caseína tiene el mismo frente de migración que la γ_3 -CN, de allí el alto valor obtenido para esta relación, cuando consideramos la leche.

Nota: los valores son promedio de muestras sembradas por cuadruplicado.

El supraíndice indica la diferencia significativa entre la comparación de las distintas temperaturas de cocción. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Los resultados mostrados, nos permiten observar que la temperatura de cocción durante el trabajo en tina en la elaboración de los quesos de pasta no cocida o cocida prensada, tiene influencia sobre la proteólisis primaria durante la maduración de los quesos. El aumento de dicha temperatura, ha causado una inducción de la hidrólisis de la β -caseína y un incremento de las γ -caseínas, como puede verse en la Tabla XII. La hidrólisis de esta proteína ha sido utilizada como marcador de la maduración (Gaiaschi et al., 2001).

Estudios realizados por Lane y Fox (1999) sobre las acciones individuales de la quimosina y la plasmina en la proteólisis de la caseína, muestran que esta última es la responsable de

la degradación de la β -caseína dando como productos las γ -caseínas y proteosa peptona. Los mismos autores observaron que la plasmina podía seguir actuando sobre péptidos menores resultado de la acción del coagulante, en cambio la quimosina, era incapaz de hidrolizar las γ -CN o la proteosa peptona.

Los porcentajes relativos de las γ -caseínas se ven incrementados para los quesos que fueron tratados a mayor temperatura de cocción. Con respecto al Grupo 1, para los quesos tratados de 32 a 45 °C, el aumento de PLM observado, está de acuerdo con el incremento en la proteólisis. Sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados, los quesos sometidos a temperaturas de cocción de 50 y 55 °C, retuvieron menor concentración absoluta del par PLM/PLG que aquéllos del Grupo 1, pero en todos los casos, el porcentaje relativo de PLM se incrementó. Un factor que debemos tomar en cuenta para explicar estos resultados es el tiempo de maduración. Los quesos del Grupo 1 (con temperaturas de cocción de 32 a 45 °C) desarrollaron su maduración a lo largo de 45 días y en cambio los pertenecientes al Grupo 2, lo hicieron en 75 días. Podemos inferir que, la plasmina, retenida en cantidades menores, se mantiene activa a lo largo de la maduración (datos presentados en la Tabla IX) y sigue actuando sobre la β -CN hasta hidrolizar el 50% de la misma, como surge del valor de (93.4%) para la relación de $[(\Sigma \gamma / \beta) \times 100]$ (Tabla XI). Otros autores, entre ellos Somers et al (2002) y Upadhyay et al. (2004), informan un incremento de la hidrólisis de la β -CN cuando aumenta la actividad de la plasmina en quesos experimentales.

Otro hecho remarcable a tener en cuenta, es el que ocurre con la proteólisis primaria de la alfa-caseína. Gaiaschi et al. (2000), entre otros, evaluaron la hidrólisis de esta proteína como indicador de la maduración en el queso Grana Padano. En nuestro estudio, observamos que, al aumentar la temperatura de cocción de la cuajada, disminuye la degradación de la α_{s1} -CN para dar α_{s1} I-CN (Figura 19, Tabla XII). En el Grupo 1, esta relación decrece de 75.0 a 42.4% para los quesos tratados a 32 y 45 °C respectivamente, debido presumiblemente a la inactivación parcial del coagulante utilizado (quimosina y pepsina bovina en una relación de 90:10) a esta temperatura. Además, los fermentos utilizados en este grupo fueron mesófilos, por lo que su acción se vió también disminuida. Este efecto es también informado por Somers y Kelly (2002). Cuando consideramos la tecnología empleada para elaborar los quesos del Grupo 2, el coagulante no varió y los fermentos son termófilos. A pesar de haber mostrado que a 45 °C la acción del coagulante se vió significativamente reducida, la acción sinérgica de las proteasas de los fermentos,

permitieron incrementar la proporción de hidrólisis de la α_{s1} -CN al valor de 48.7% al incrementarse la temperatura en 5 °C.

En la corrida electroforética y en la tabla correspondiente, puede observarse un producto de frente de migración mayor (pico 23) que aparece en los quesos tratados a 32, 36 y 40 °C y no aparece en los quesos tratados a temperaturas mayores a los 45 °C. Esta observación nos permite inferir que se trata de un producto de hidrólisis de la α_{s1} -CN, y cuyo responsable es el coagulante, que no lo produce a estas temperaturas por estar parcialmente inactivado.

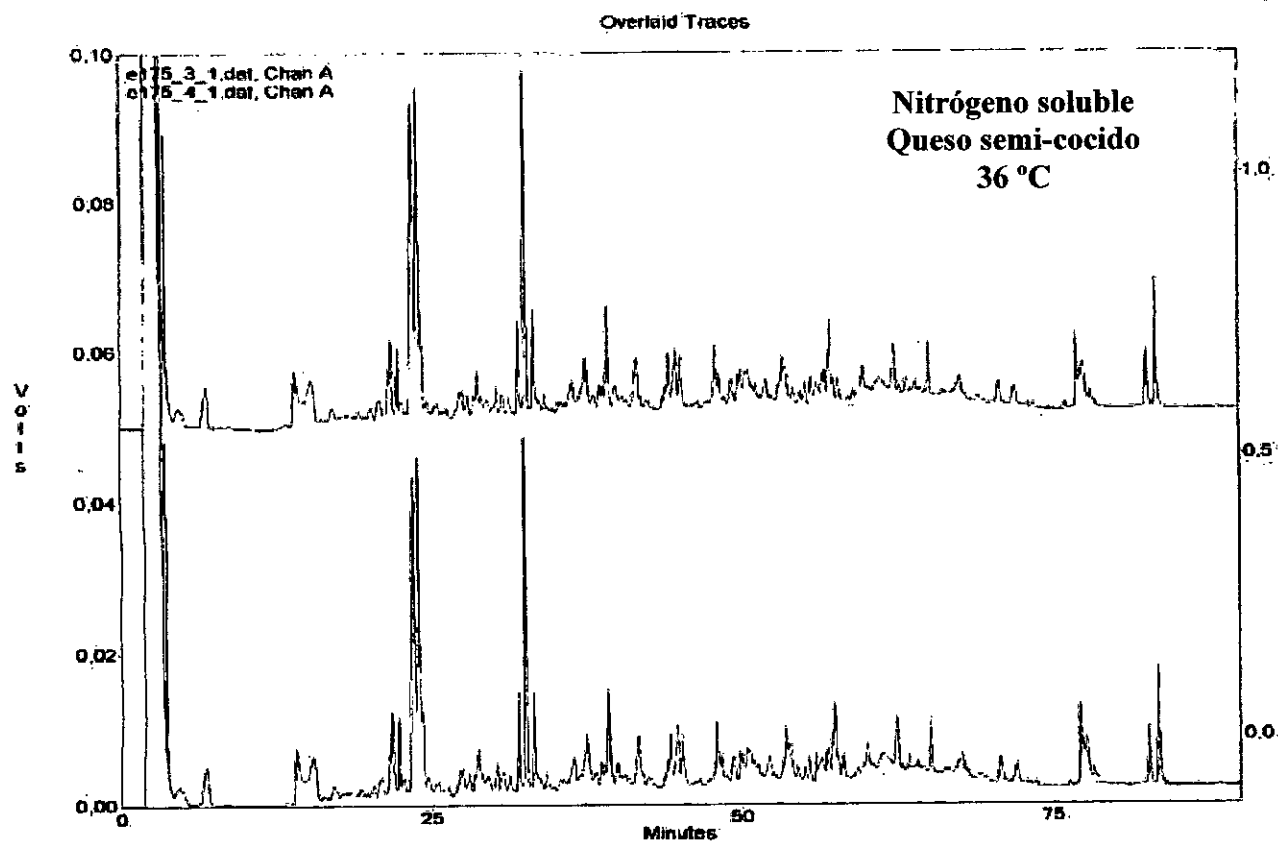
Los resultados de los indicadores de la proteólisis observados en la Tabla XII, nos demuestran que la relación porcentual del NS/NT refleja un aspecto parcial que debe ser considerado para el estudio de la maduración. Para tener un conocimiento más profundo de la maduración, este índice debe complementarse con los perfiles caseínicos y peptídicos.

4.1.4.3. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN SOLUBLE A pH 4.4

Se llevó a cabo el análisis por RP-HPLC de la fracción soluble a pH 4.4. Esta fracción representa el Nitrógeno Soluble, de los quesos al final de su período de maduración, de acuerdo al protocolo presentado en Materiales & Métodos.

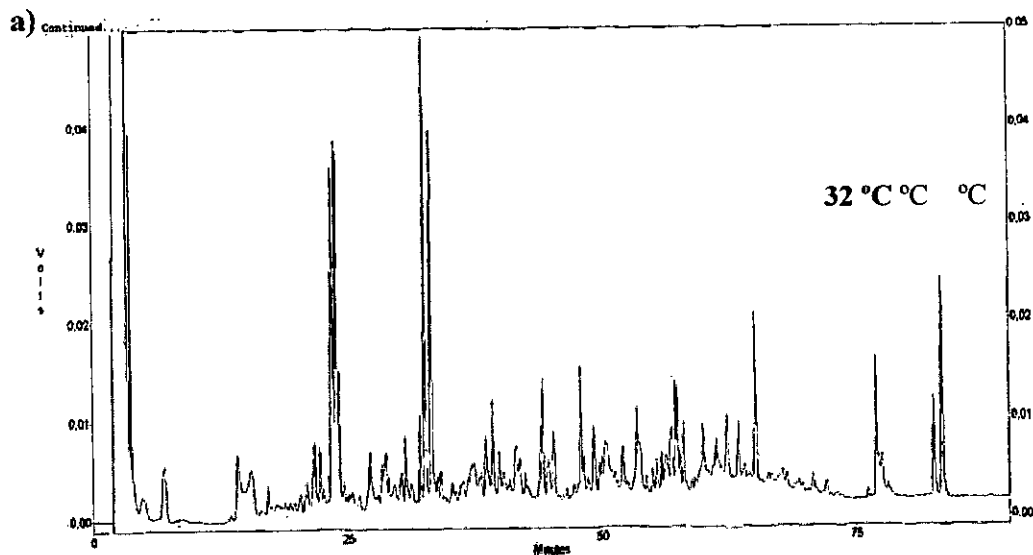
Se analizaron los duplicados de los extractos pertenecientes a quesos elaborados a 36 °C. Se encontró una muy buena repetibilidad, como puede observarse en la **Figura 20**.

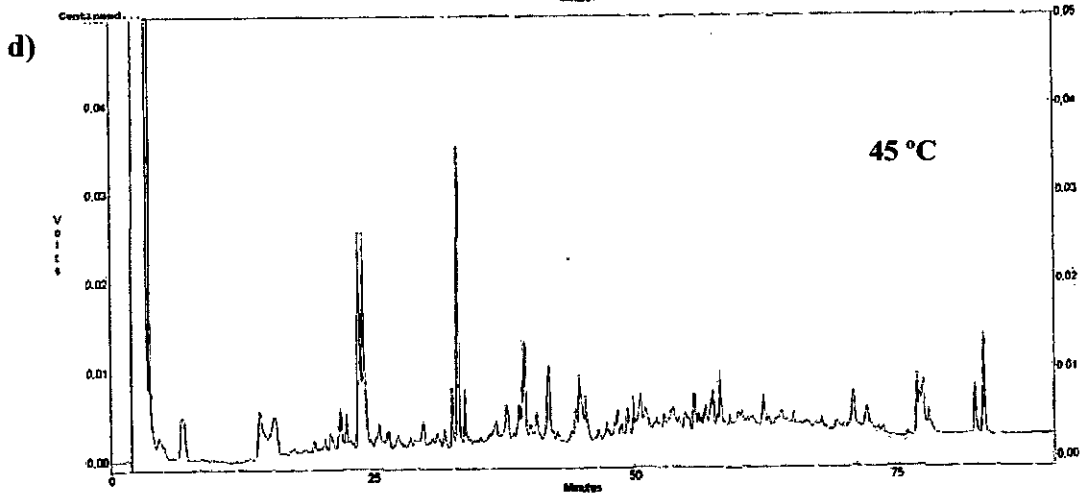
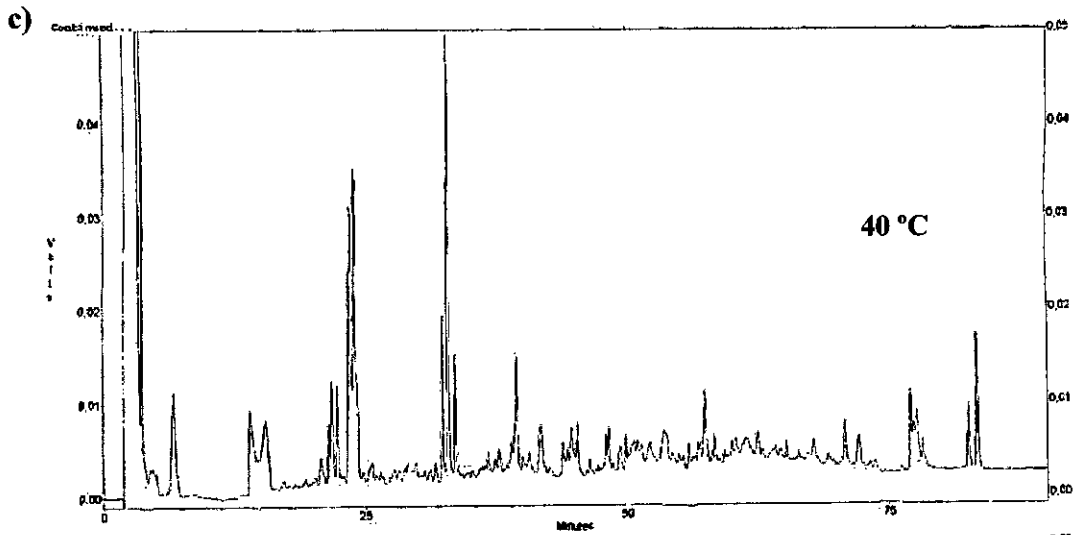
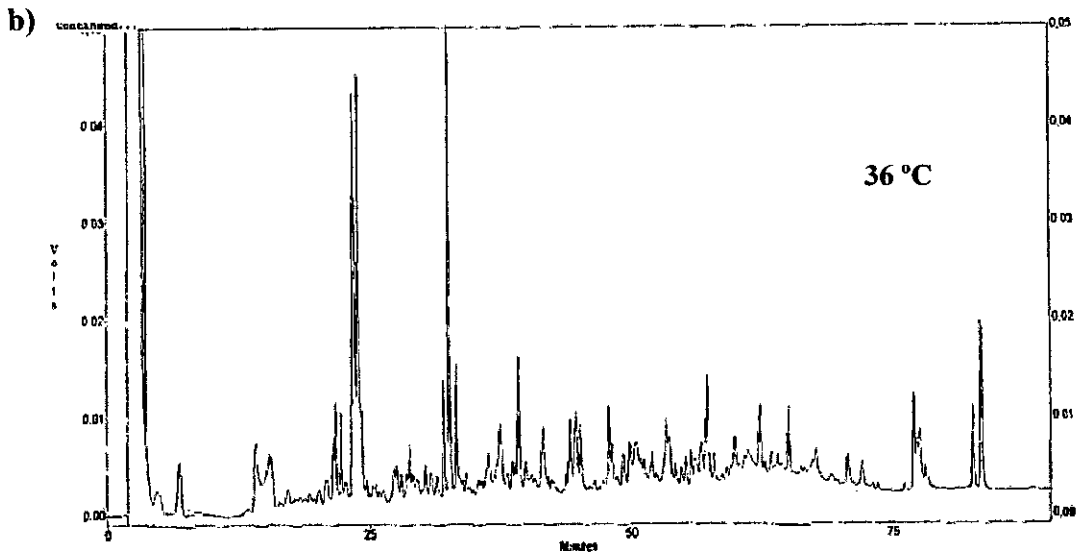
Figura 20: cromatogramas RP-HPLC de los extractos solubles a pH 4.4 pertenecientes a los quesos elaborados a 36 °C pertenecientes a dos tinas distintas.



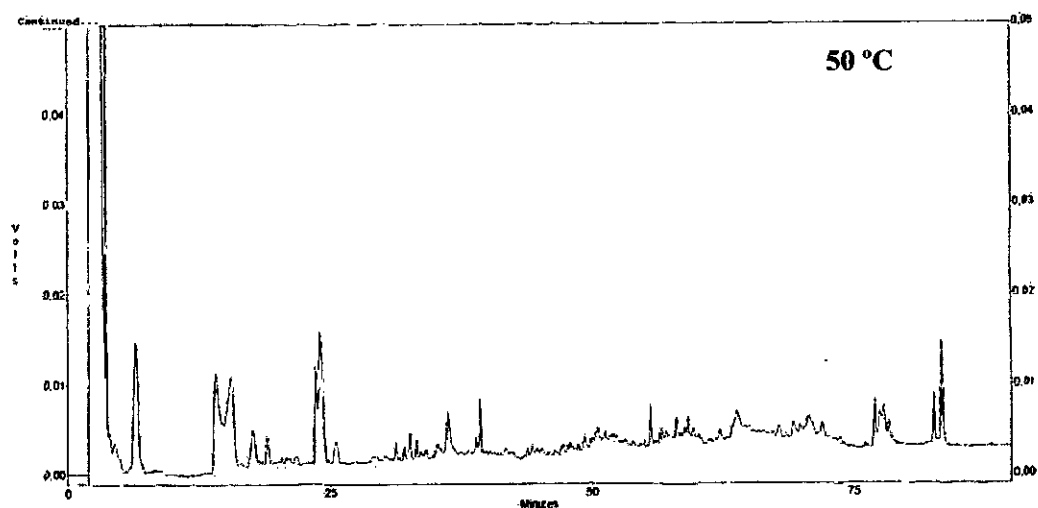
En la **Figura 21** se presenta una selección de los cromatogramas más representativos.

Figura 21: cromatogramas RP-HPLC de los extractos solubles a pH 4.4 pertenecientes a los quesos elaborados con distintas temperaturas de trabajo en tina, al final del período de maduración. a, b, c, d, e y f correspondiente a 32, 36, 40, 45, 50 y 55 °C respectivamente.

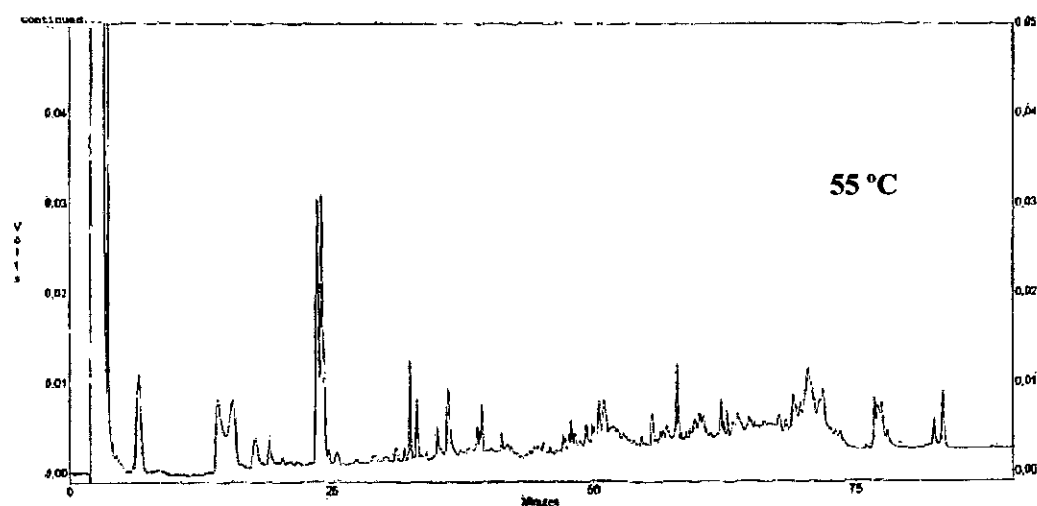




e)



f)



Se observan diferencias cuantitativas entre los extractos pertenecientes a las distintas muestras. En los quesos del Grupo 1, se observa una disminución gradual de los péptidos que eluyen alrededor de los 24 y 30 minutos, así como una disminución de los péptidos con mayor tiempo de elución. Los extractos pertenecientes al Grupo 2, se caracterizan por presentar un perfil cualitativamente similar a los anteriores, pero muy disminuido en el área. Dentro de este grupo, el área de estos picos aumenta a medida que aumenta la temperatura de cocción de 50 a 55 °C. Estos péptidos no fueron identificados. Sin embargo aquéllos que eluyen a 24 y 30 min, parecieran ser producidos por la acción de la enzima coagulante, ya que acompañan la tendencia de la degradación de la α_{s1} -CN por la quimosina. Por comparación del perfil peptídico con otros autores (McSweeney, 2004) inferimos que se trata de las lactocepinas, fragmentos f1-9 y f1-13 de la α_{s1} -CN. Adicionalmente, podríamos pensar que una parte de los péptidos fueron aún más

profundamente hidrolizados a aminoácidos y péptidos menores que no vemos en estos cromatogramas.

Los picos correspondientes a la elución entre 75 y 90 minutos, podrían corresponder a la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulinas respectivamente. Estos picos disminuyen con la temperatura a la que fueron sometidos los quesos ya que son termosensibles y se desnaturalizan parcialmente con el calor.

4.1.5. CONCLUSIONES

En lo que respecta a la retención del par PLM/PLG y su actividad, en el presente estudio hemos observado dos grupos bien definidos entre los quesos analizados: los del Grupo 1, que fueron tratados con temperaturas de cocción en tina que variaron de 32 a 45 °C y los del Grupo 2 que sufrieron un proceso de cocción de 50 y 55 °C.

La retención del par PLM/PLG no presentó diferencias significativas en el primer grupo, sin embargo, después de la disminución observada probablemente producida por el cambio de fermentos, la concentración del par aumentó cuando la cuajada fue tratada a 55 °C. Con respecto a la concentración de PLM en los quesos jóvenes, ésta aumentó a medida que aumenta la temperatura de trabajo de 32-36 °C a 40-45 °C, luego descendió al cambiar el protocolo y finalmente presentó el valor más alto para los quesos tratados a 55 °C.

Con respecto a la actividad enzimática, ésta aumentó suavemente a medida que aumentó la temperatura de cocción de los quesos del Grupo 1, y sufrió una disminución drástica cuando se estudiaron los quesos tratados a 50 y 55 °C. Comparando los quesos dentro del Grupo 2, el incremento de la temperatura de trabajo en tina produjo un incremento significativo en la actividad de la PLM.

Si bien los quesos tratados a 50 y 55 °C mostraron una fuerte reducción de la concentración total del par y de la actividad de la PLM y la derivada del PLG retenidas en la cuajada, la relación porcentual de PLM con respecto al sistema PLM/PLG, aumentó gradualmente con el aumento de la temperatura de cocción tanto para la concentración como para la actividad respectivamente (Tablas VI y X).

Las diferencias de concentración y actividad del par PLM/PLG entre ambos grupos antes mencionadas no pudieron ser explicadas por una diferencia en el pH de los quesos ya que éstos fueron coagulados por enzimas coagulantes, coagulación dulce, de forma tal que el pH de la cuajada nunca fue inferior a 4.6. El pH de desuerado fue de alrededor de 6.62 para el Grupo 1 y de 6.55 para el Grupo 2 , y de 5.53 y 5.85 para los quesos después de 4 hs de prensado respectivamente. El pH de la salmuera fue de 5.08 a 5.20 (Anexo 1, Cartas de fabricación 1b, 2b y 3b).

Consideramos que el empleo de fermentos constituidos por bacterias termófilas y las temperaturas de cocción en tina de 50, y 55 °C, contribuyeron a la disminución de la concentración y actividad del par PLG/PLM. Farkye y Fox (1990) habían concluido anteriormente que la actividad total de la PLM disminuía con el aumento de la temperatura en un rango de temperaturas de 30 a 60 °C en cuajadas experimentales donde no eran incorporados fermentos. Este efecto podría deberse a la inhibición causada por las interacciones temperatura dependientes de los tiol-disulfuros entre la PLM y la β -Lg (Bastian et al. 1993; Kelly y Foley, 1997; Enright y Kelly, 1999). Éstas tendrían como hipótesis la dificultad de acceso de la enzima debido a la unión a la superficie de las micelas de caseína de proteínas de suero modificadas, generando un impedimento estérico concomitante al acercamiento de las uniones peptídicas de las moléculas del sustrato (Benfeldt, 1997).

La fuerte disminución de la actividad y concentración del par enzimático, experimentada en los quesos del Grupo 2 podría también verse afectada por el crecimiento de las bacterias presentes en el fermento y la producción de proteasas microbianas extracelulares responsables de la desestabilización de la micela y la liberación de la PLM de la fracción caseínica. Un efecto similar ha sido antes observado por Fajardo-Lira y Nielsen (2000) y Hayes et al. (2000) en bacterias psicrótrofas en leche.

Tal vez, en el caso del presente estudio, ambos factores antes mencionados, hayan influenciado el descenso pronunciado, ya que no se observaron concentraciones ni actividades crecientes de PLM y derivada del PLG en suero.

En ausencia de caseína, la PLM pareciera no ser muy termoestable, y ciertamente no lo es en presencia de compuestos que contengan grupos-SH. Metwalli et al. (1998), mostraron

recientemente que la PLM en una solución de leche, se despliega probablemente a bastante baja temperatura. Sus resultados indicaron que el efecto desestabilizador de los compuestos que contienen grupos sulfhidrilos comienzan a temperaturas de 45 °C. A esta temperatura es cuando el desplegamiento comienza a hacerse notorio y puede ser percibido. Ésto probablemente significa que los grupos sulfhidrilo de la PLM estarían inaccesibles dentro de la molécula plegada y por lo tanto no serían reactivos. Las temperaturas involucradas son coincidentes con las empleadas en el Grupo 2 y la diferencia de concentración de PLM determinada por ELISA y la de la actividad, también podría ser explicada por esta tercera hipótesis.

La actividad de PLM en el suero fue en todos los casos menor que la correspondiente a la leche o queso, probablemente debido a la incorporación eficaz de la enzima en la cuajada como resultado de su unión con las caseínas (Bastian et al, 1996).

El aumento de la temperatura de cocción de la masa dentro del Grupo 1, de 32 a 45 °C, empleando bacterias mesófilas como fermentos, condujo a un aumento notorio de la hidrólisis de la β -caseína para dar γ -caseínas. Esto concuerda con los resultados publicados por Farkye y Fox (1990) y Delacroix-Buchet y Fournier (1992). Durante la maduración, el porcentaje relativo de PLM activa también se incrementó posiblemente debido a la pérdida del inhibidor de la plasmina en el suero o a su inactivación térmica.

Adicionalmente, según los resultados encontrados para los indicadores de la actividad de la quimosina ($(\alpha_{s1I}/\alpha_{s1} + \alpha_{s1I}) \times 100$), el aumento de la temperatura de cocción disminuyó la actividad de la enzima coagulante debido probablemente a la inactivación de la misma por el calor.

Los perfiles peptídicos de la fracción soluble a pH 4.4 mostraron diferencias. Esta evaluación resultó complementaria de la de las electroforesis ya que la totalidad de las fracciones proteicas son estudiadas por ambas técnicas.

El aporte de la relación porcentual del NS/NT al conocimiento del proceso de maduración es limitada. Nuestros resultados muestran que a similitud de estos índices, existe una modificación significativa de los perfiles caseínicos y peptídicos.

4.2. EFECTO DEL TIEMPO DE MANTENIMIENTO DE LA TEMPERATURA DE COCCIÓN DE LA CUAJADA, EN LA RETENCIÓN DEL PAR PLM-PLG Y EN LA ACTIVIDAD DE LA PLASMINA Y LA DERIVADA DE SU PRECURSOR, EL PLASMINÓGENO, EN LA PROTEOLISIS PRIMARIA DURANTE LA MADURACIÓN DE LOS QUESOS (ENSAYO 2).

Con el objetivo de comparar el efecto del tiempo de cocción, el estudio se llevó a cabo en quesos de pasta semicocida tipo Pategrás ó Gouda y cocida prensadas del tipo Comté. Los protocolos experimentales basados en la tecnología industrial para ambas tecnologías, sugieren un tiempo de agitación de 30 minutos desde el comienzo del gradiente de temperatura. En el presente trabajo, se estudiaron tiempos de 20 y 40 minutos de mantenimiento, una vez alcanzada la temperatura establecida para cada variedad.

4.2.1. COMPOSICIÓN MAYORITARIA DE LOS QUESOS

La composición de la leche recibida y utilizada como materia prima en la elaboración de los quesos, fue regular a lo largo de todas las experiencias, y los duplicados de cada tipo de queso elaborados el mismo día fueron, por lo tanto considerados duplicados. Como fuera mencionado anteriormente, la materia prima fue estandarizada para obtener una relación final de grasa/proteína igual a uno y pasteurizada a 72 °C durante 15 segundos.

La composición de los quesos jóvenes salidos de salmuera previo encerado y de los madurados se resumen en la **Tabla XIII**.

TABLA XIII: Composición físico-química de los quesos elaborados utilizando temperaturas de cocción de 42 y 54 °C durante tiempos de mantenimiento de 20 y 40 minutos de para cada temperatura. Quesos jóvenes y madurados.

<i>Quesos jóvenes</i> (salidos de salmuera, 20 hs)						
Quesos	pH		Extracto seco		NT/ES	
	X	DE	X	DE	X	DE
GRUPO 1						
42/20	5.42 ^a	0.02	56.68 ^a	0.66	6.69 ^a	0.73
42/40	5.45 ^b	0.01	58.75 ^b	0.58	6.69 ^a	0.62
GRUPO 2						
54/20	5.38 ^c	0.01	63.81 ^c	0.09	6.86 ^a	0.12
54/40	5.35 ^d	0.00	63.22 ^c	0.37	6.98 ^a	0.51

<i>Quesos madurados</i> (final período de maduración)										
Quesos	pH		Extracto seco		Materia grasa		NaCl		NT/ES	
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
GRUPO 1										
42/20	5.32 ^a	0.01	57.41 ^a	0.30	6.64 ^a	0.34	1.45 ^a	0.03	49.83 ^a	0.28
42/40	5.35 ^a	0.05	58.08 ^a	0.67	6.63 ^a	0.75	1.23 ^a	0.05	49.26 ^a	0.51
GRUPO 2										
54/20	5.65 ^b	0.00	63.48 ^b	0.11	6.96 ^b	0.20	0.72 ^b	0.02	50.25 ^a	0.23
54/40	5.64 ^b	0.02	63.77 ^b	0.55	6.85 ^{ab}	0.57	0.71 ^b	0.01	49.66 ^a	0.25

Nota: Promedio (X) y desvío estándar (DE) de determinaciones realizadas por duplicado en muestras de cada una de los dos quesos elaborados en distintas tinas. n=4.

* El supraíndice indica la diferencia significativa entre la comparación de los distintos tiempos de cocción. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes (P<0.05).

Los resultados obtenidos para los quesos que sufrieron un proceso de cocción a 42 °C y 54 °C durante 20 y 40 minutos respectivamente, fueron comparables con los datos observados para aquéllos tratados en el rango de 40-45 y 50-55 °C, respectivamente (Tabla V) del Ensayo 1. Ésto era lo esperado debido a que se utilizaron tecnologías de elaboración similares.

Se observaron diferencias significativas en el pH y el extracto seco (excepto para los quesos del Grupo 2) de los quesos jóvenes elaborados con los distintos tiempos de mantenimiento de la temperatura en la etapa de cocción. Éstos presentaron valores levemente superiores cuando se los trató durante 40 minutos. No se observaron diferencias significativas en la relación del NT/ES.

No se observaron diferencias significativas en la composición de los quesos madurados elaborados con los distintos tiempos de mantenimiento de la temperatura en la etapa de cocción. No se observaron diferencias significativas en la relación Nitrógeno total/ Extracto seco entre ambas tecnologías estudiadas.

Los quesos madurados se presentan en las Figuras 22 y 23

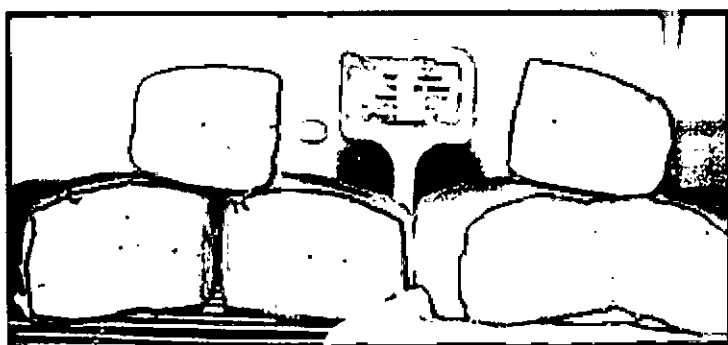


Figura 22. Quesos de pasta prensada semi-cocida correspondiente a la tecnología de quesos Pategras ó Gouda tratados a 42 °C durante 20 y 40 minutos respectivamente.

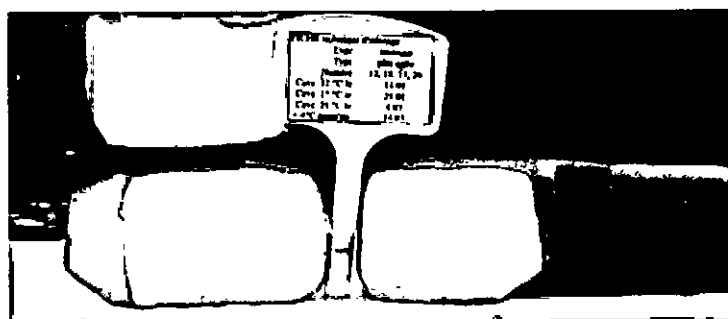


Figura 23. Quesos de pasta prensada cocida correspondientes a la tecnología de queso Comté tratados a 54 °C durante 20 y 40 minutos respectivamente.

4.2.2. RETENCIÓN DEL PAR PLASMINA/ PLASMINÓGENO

4.2.2.1. CONCENTRACIÓN DE PLASMINA Y PLASMINÓGENO EN QUESO Y SUERO

Las concentraciones de la enzima Plasmina (PLM) y de su precursor Plasminógeno (PLG) en queso, suero, y leche utilizada como materia prima, según los resultados obtenidos por el método ELISA, se resumen en la **Tabla XIV**. Con el fin de poder comparar y eliminar la variable de la humedad de la masa del queso, los resultados se expresaron en concentración de PLM, PLG o del par PLM + PLG con respecto al extracto seco.

TABLA XIV: *Concentración de PLG + PLM y concentración del PLG en quesos de 20 hs elaborados a 42 y 54 °C de cocción en tina y distinto tiempo de mantenimiento y sus respectivas concentraciones en suero.*

Temperatura (°C)/ tiempo (min)	QUESO						SUERO						
	PLG		PLG + PLM		PLM	%	PLG		PLG + PLM		PLM	%	
	(ug/g ES)						(ug/ml)						
	X	DE	X	DE			X	DE	X	DE			
GRUPO 1													
42/20	15.30 ^a	1.49	25.83 ^a	2.04	10.53	40.8	0.41 ^a	0.02	0.67 ^a	0.10	0.26	38.8	
42/40	15.28 ^a	0.25	25.00 ^a	2.12	9.72	38.8	0.40 ^a	0.08	0.62 ^a	0.08	0.22	35.5	
GRUPO 2													
54/20	4.72 ^b	0.56	10.04 ^b	1.04	5.32	53.0	0.42 ^a	0.10	0.57 ^a	0.14	0.15	26.3	
54/40	4.56 ^b	0.62	10.84 ^b	0.26	6.28	57.9	0.42 ^a	0.07	0.58 ^a	0.14	0.16	27.6	
leche (ug/ml)	1.33	0.06	1.95	0.18	0.62	31.1							

Nota: los resultados mostrados en la Tabla XIII corresponden al promedio (X) y desvío estándar (DE) de 6 determinaciones para cada parámetro.

* El supraíndice indica la diferencia significativa entre la comparación de los distintos tiempos de. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes (P<0.05).

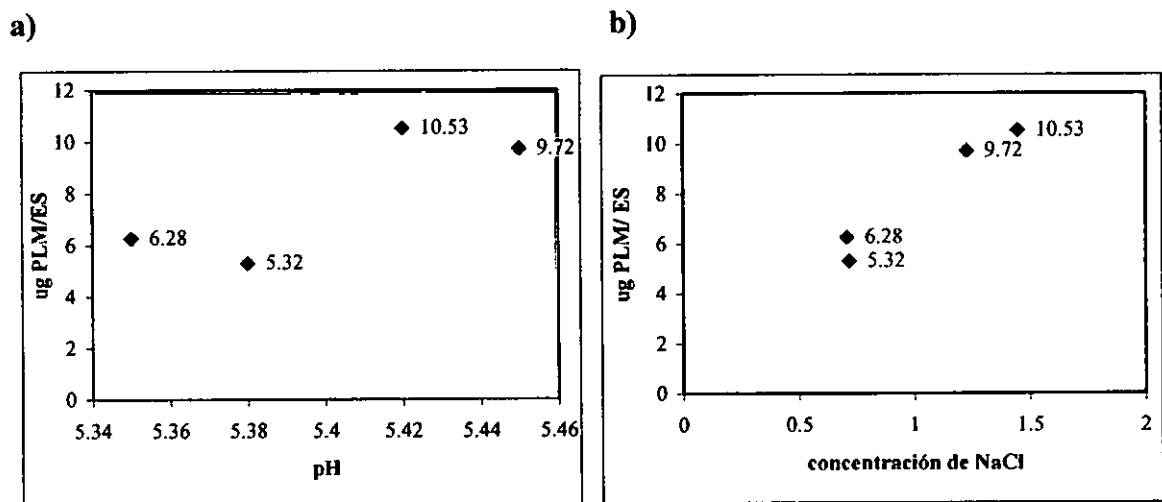
Con respecto al efecto del tiempo de mantenimiento de la cocción en la retención del par PLM/PLG en los quesos jóvenes, los resultados no muestran diferencias significativas al modificar el tiempo de 20 a 40 minutos. En un trabajo previo, Bouquet y Dupont (1997) mostraron que además de la temperatura de calentamiento había otros dos factores que afectaban la retención del par: la duración del calentamiento y la presión a la que era sometido el queso durante el prensado. Los autores observaron que al aumentar la duración del trabajo en tina de 20 a 40 minutos, se provocaba una disminución de la concentración de PLG retenida en quesos jóvenes y sugirieron tratar los quesos a altas temperaturas durante períodos cortos para obtener mayor concentración de plasmina retenida en la

cuajada y lograr una reducción en el tiempo de maduración. Nuestros resultados no muestran diferencias entre las condiciones empleadas.

Los resultados obtenidos para la retención del par PLM/PLG en la masa de quesos jóvenes relacionados con el efecto del tiempo de mantenimiento de la temperatura de cocción (20 y 40 minutos), no mostraron diferencias significativas en ambos casos (Grupos 1 y 2) por lo cual concluimos que en nuestro estudio, este factor no tiene efecto observable en la retención de la concentración del par.

La relación de la concentración de plasmina en la masa del queso joven con el pH y el contenido en NaCl pueden verse en la **Figura 24 a y b**.

Figura 24 a) y b): a) relación de la concentración de PLM con el pH y b) con el contenido en NaCl en el queso.



Observamos que a valores de pH crecientes, la retención de PLM también presenta una tendencia creciente. Resultados similares fueron obtenidos para el Ensayo 1, Figura 14. Adicionalmente, cuando estudiamos quesos con contenido de NaCl crecientes, la concentración de la pLM presenta una tendencia también creciente. Estos resultados muestran que para los niveles de sal estudiados, ésta variable no es determinante para la retención.

Los resultados presentados en la tabla anterior, muestran que se observa nuevamente el descenso del par PLM/PLG en la cuajada cuando la tecnología empleada es la de queso de masa cocida prensada a temperaturas entre 50 y 55 °C como el caso del Comté entre otros.

Los porcentajes de PLM observados en queso y suero para los quesos de pasta semicocida prensada (Grupo 1), fueron similares entre sí. El porcentaje de PLM en suero representa el 92% del encontrado en el queso salido de salmuera. Estos valores muestran que la activación del precursor ha ocurrido durante el trabajo en tina y por lo tanto, tanto el suero como el queso salido de salmuera, presentan el mismo porcentaje de PLM. En el Grupo 2, en cambio, el porcentaje de PLM en suero representa el 48% del porcentaje en el queso joven indicando que la activación del PLG en PLM ha ocurrido durante el proceso de trabajo en el molde, salado y almacenamiento en cámara previo al encerado como se observó en el Ensayo 1.

Los resultados que se muestran en la **Tabla XV**, corresponden a las concentraciones de PLM y PLG en la masa total de los quesos jóvenes salidos de salmuera (20 hs posterior a su elaboración) y a la correspondiente al suero considerando el volumen total del mismo durante el desuerado.

TABLA XV: *Concentración total del par PLG + PLM en queso y suero considerando el peso del queso y el volumen de desuerado obtenidos en cada experimento.*

Temp (°C)/ tiempo (min)	Peso del queso (g)		PLG + PLM				Total (mg)	Recuperación (%)
			Queso (mg)		Suero (mg)			
	<i>X</i>	<i>DE</i>	<i>X</i>	<i>DE</i>	<i>X</i>	<i>DE</i>	<i>X</i>	
42/20	1198 ^a	16.0	17.54 ^a	0.23	7.40 ^a	0.50	24.94	107
42/40	1162 ^b	10.2	17.06 ^a	0.15	6.87 ^a	0.44	23.93	99
GRUPO 2								
54/20	985 ^c	4.2	6.31 ^b	0.23	6.40 ^a	0.78	12.71	55
54/40	998 ^c	9.9	6.84 ^b	0.35	6.53 ^a	0.79	13.37	58
Leche							23.18	

Nota: los resultados corresponden a promedios de dos mediciones realizados sobre cada uno de dos quesos considerados replicados para cada característica. n=4.

* El supraíndice indica la diferencia significativa entre la comparación de los distintos tiempos de cocción. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes (P<0.05).

De la evaluación de los resultados presentados en la tabla anterior, se observa nuevamente que la concentración total de PLM + PLG varió de acuerdo a las condiciones de elaboración utilizadas y presentaron una marcada disminución del 38 % en promedio en los quesos tratados a 54 °C, marcando nuevamente la tendencia de un cambio drástico en ese punto. La recuperación del complejo siguió la misma tendencia que en el Ensayo 1, alcanzando valores cercanos a 100 % para los quesos tratados a 42 °C y de 55-58 % para los tratados a 54 °C.

4.2.2.2. ACTIVIDAD DE PLASMINA Y DERIVADA DEL PLG

Las actividades correspondientes a la plasmina y a la derivada del plasminógeno, también fueron estudiadas. Los resultados obtenidos a lo largo de la maduración pueden verse en la Tabla XVI.

TABLA XVI: actividad de PLM y derivada del PLG en quesos jóvenes de 20 hs y madurados.

Temperatura/ tiempo °C/min	act PLM/ ES				act deriv PLG /ES			
	20 hs		madurados		20 hs		madurados	
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
42/20	1,877 ^a	0.024	2,305 ^a	0.008	8,256 ^a	0,061	7,404 ^a	0,059
42/40	1,698 ^b	0.016	2,390 ^b	0.052	7,631 ^b	0,028	7,443 ^a	0,069
54/20	1,296 ^c	0.032	0,836 ^c	0.037	3,278 ^c	0,086	2,522 ^b	0,044
54/40	1,494 ^d	0.104	1,226 ^d	0.019	3,304 ^c	0,066	2,578 ^b	0,115

Actividad potencial total				% PLM	
20 hs		madurados		20 hs	madurados
X	DE	X	DE		
10.13 ^a	0.04	9.71 ^a	0.03	18.53 ^a	23.74 ^a
9.33 ^b	0.02	9,83 ^b	0.06	18.20 ^b	24.31 ^b
4.57 ^c	0.06	3.36 ^c	0.06	28.36 ^c	24.88 ^c
4.80 ^d	0.08	3,80 ^d	0.07	31.12 ^d	32.26 ^d

* El supraíndice indica la diferencia significativa entre la comparación de los distintos tiempos de cocción. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Al igual que en el Ensayo 1, la actividad de la PLM aumentó significativamente a lo largo de la maduración de los quesos tratados a 42 °C y disminuyó en los quesos del Grupo 2. La actividad total acompaña la tendencia de la concentración (Tabla XV), ya que se redujo en un 62% cuando estudiamos los quesos sometidos a la tecnología correspondiente a quesos de pasta cocida prensada.

Con respecto a la actividad de la PLM y la derivada del PLG, así como la actividad total en quesos jóvenes, el efecto del mantenimiento de la temperatura muestra tendencias distintas para los dos grupos de quesos. En los del Grupo 1, se observa mayor actividad de la PLM y derivada del PLG en los quesos cocidos durante 20 minutos, mientras que en el Grupo 2, el resultado es inverso. Concluimos que el factor del tiempo de mantenimiento de la cocción, no tiene un efecto observable común a las dos tecnologías en la actividad del par PLM/PLG en quesos jóvenes.

En los quesos madurados, en todos los casos, la actividad de la PLM resultó mayor en los quesos tratados durante 40 minutos. La actividad derivada del PLG no presentó diferencias significativas en este caso.

4.2.3. INDICADORES DE LA PROTEOLISIS

4.2.3.1. EVALUACIÓN DE LAS FRACCIONES NITROGENADAS

Los resultados obtenidos para la relación Nitrógeno soluble/ Nitrógeno total se muestran en la **Tabla XVII**.

TABLA XVII: *nitrógeno soluble a pH 4.4 como porcentaje (%) del Nitrógeno total al comienzo (quesos 20 hs) y final de la maduración y la diferencia entre ambos valores.*

NS/NT x 100					
temperatura °C/ tiempo (min)	quesos 20 hs		quesos madurados		Diferencia
	<i>X</i>	<i>DE</i>	<i>X</i>	<i>DE</i>	
GRUPO 1					
42/20	3.38 ^a	0.07	12.02 ^a	0.05	8.7
42/40	3.28 ^a	0.05	11.67 ^b	0.10	8.4
GRUPO 2					
54/20	4.22 ^b	0.04	14.30 ^c	0.10	10.1
54/40	3.95 ^c	0.14	14.44 ^c	0.10	10.5

Nota: Promedio (*X*) y desvío estándar (*DE*) de (n=4) determinaciones realizadas por duplicado en muestras de cada una de los dos quesos elaborados en 2 distintas tinas.

* El supraíndice indica la diferencia significativa entre la comparación de los distintos tiempos de cocción. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes (P<0.05).

Los quesos cocidos a 54 °C presentaron valores más altos de la relación NS/NT x 100. También presentaron valores superiores de la diferencia entre los quesos madurados y jóvenes. Esta es la misma tendencia observada en los quesos del Ensayo 1, sin embargo en este caso los valores fueron inferiores a los informados precedentemente.

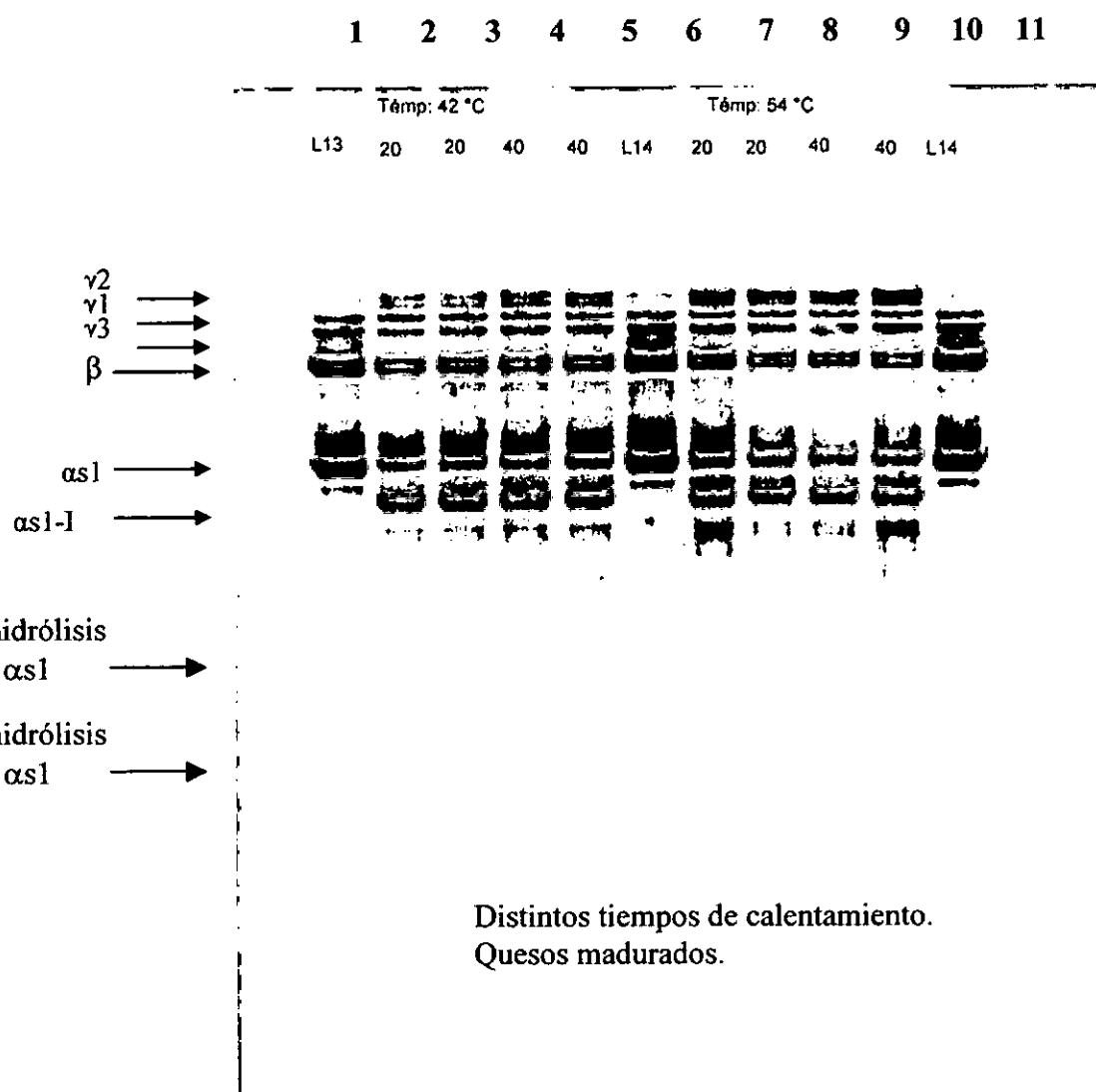
No se observaron diferencias significativas en la diferencia a lo largo de la maduración entre los quesos sometidos a igual temperatura de trabajo en tina y distinto tiempo de mantenimiento. Si comparamos el Índice de Maduración (*Im*) entre los quesos tratados a 20 y 40 minutos, en los quesos del Grupo 1 (42 °C), los resultados muestran que éste es mayor para aquéllos cocidos durante 20 minutos. Estos resultados concuerdan con la actividad de PLM y derivada del PLG mayores para estos quesos. En el Grupo 2 (54 °C) no se detectaron diferencias significativas.

4.2.3.2. DEGRADACIÓN DE LA FRACCIÓN CASEÍNICA

Se evaluó el efecto de la actividad de la plasmina en la proteólisis durante la maduración de los quesos elaborados a las temperaturas de 42 y 54 °C manteniendo dicha temperatura durante 20 y 40 minutos para cada caso respectivamente, y siguiendo la tecnología en uso. La metodología utilizada para evaluarlo, fue la electroforesis en geles verticales de poliacrilamida-urea, y los quesos fueron analizados al final del período de maduración.

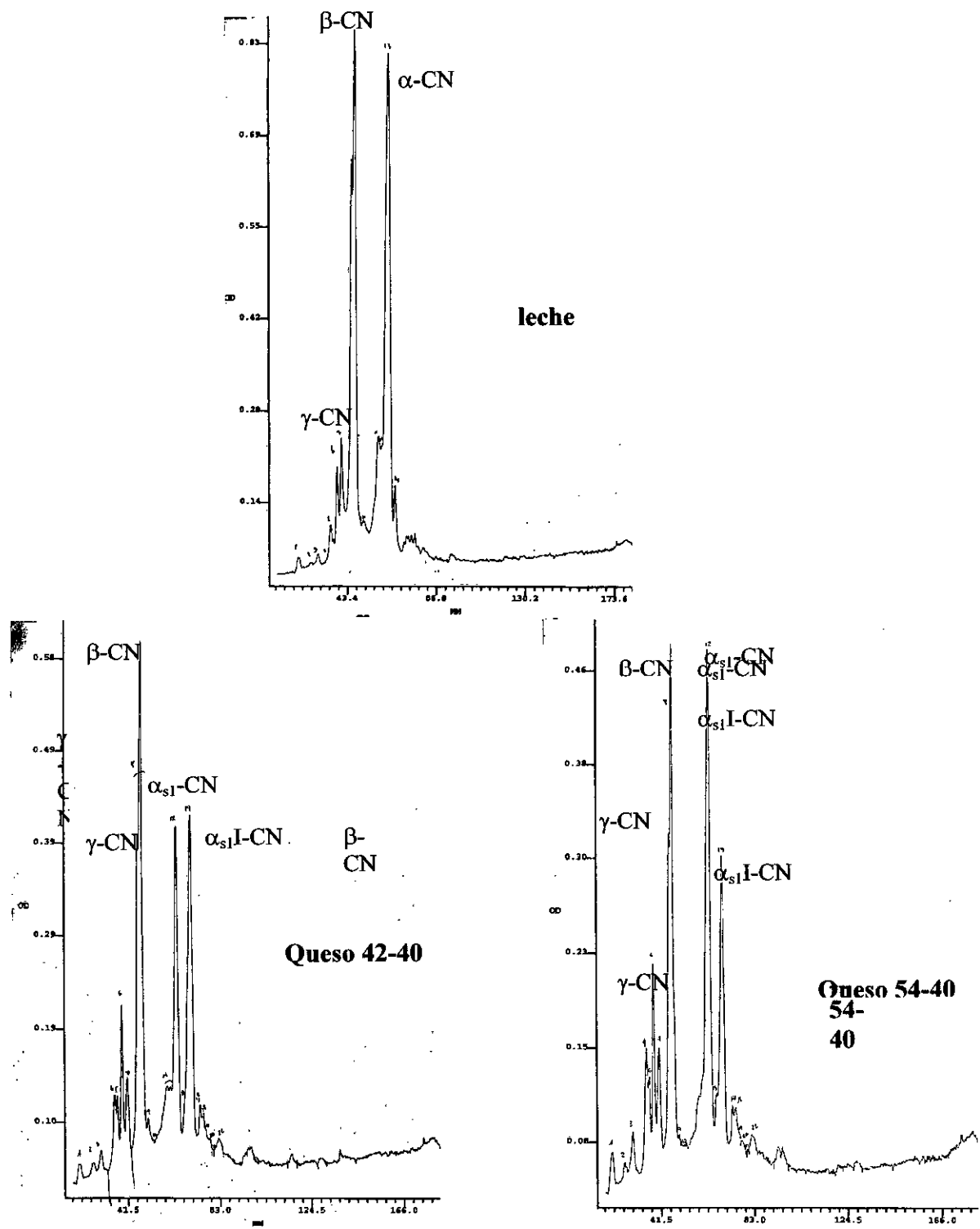
En la **Figura 25**, puede verse la separación electroforética correspondiente a las fracciones caseínicas de los quesos sometidos a 42 y 54 °C durante 20 y 40 minutos.

Figura 25: Urea-PAGE (T 12%, C 4%) de los quesos elaborados según el protocolo correspondiente y con distintas temperaturas de cocción en tina. Calles 1, 6 y 11: leche de partida, calles 2 y 3: quesos cocidos a 42 °C durante 20 minutos, calles 4 y 5: quesos cocidos a 42 °C durante 40 minutos, calles 7 y 8: quesos con cocción a 54 °C durante 20 minutos, calles 9 y 10: quesos con cocción a 54 °C durante 40 minutos al final de los respectivos tiempos de maduración.



La asignación de los picos considerados para la estimación de la proteólisis, son los mismos que para el Ensayo 1. Pueden verse algunos de los registros representativos en la **Figura 26**.

Figura 26: registros pertenecientes al Ensayo 2. Fracción insoluble a pH 4.4 de: a) leche, quesos elaborados a temperatura de cocción de b) 42 y c) 54 °C respectivamente y mantenidos en esas condiciones durante 40 minutos.



En los quesos del Grupo 2, aparece una hidrólisis de la β -caseína más pronunciada y de la α_{s1} -caseína menos pronunciada que en los que fueron tratados a 42°C. De la observación cualitativa de los electroforetogramas, no se observaron diferencias en la degradación de las caseínas con el tiempo de mantenimiento de la cocción.

Las áreas relativas de los picos correspondientes a las distintas fracciones caseínicas, se presentan en la **Tabla XVIII**.

Tabla XVIII: áreas relativas de los picos correspondientes a las distintas fracciones caseínicas y las siguientes relaciones como indicadores de la proteólisis: $(\alpha_{s1}I / \alpha_{s1} + \alpha_{s1}I) \times 100$, $(\Sigma \gamma / \beta + \Sigma \gamma) \times 100$ y $(\Sigma \gamma / \beta) \times 100$, de los quesos tratados a 42, y 54 °C durante 20 y 40 minutos, de acuerdo a la lectura densitométrica de las bandas obtenidas.

Picos	Leche		GRUPO 1				GRUPO 2			
			42/20		42/40		54/20		54/40	
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
1	1.14	0.24	1.02	0.24	1.02	0.12	1.32	0.28	0.89	0.08
2	0.37	0.05	0.70	0.05	0.72	0.00	0.99	0.16	0.71	0.07
3	0.55	0.03	1.07	0.08	1.14	0.07	1.78	0.13	1.77	0.07
4 γ_2 -CN	2.01	0.08	4.49 ^a	0.15	4.58 ^{ab}	0.24	5.82 ^b	0.12	6.01 ^{bc}	0.17
5 γ_1 -CN	3.09	0.08	4.22 ^a	0.08	4.47 ^b	0.16	5.34 ^c	0.00	5.20 ^c	0.11
6 γ_3 -CN	5.31	0.11	3.27 ^a	0.03	3.41 ^a	0.09	4.48 ^b	0.06	4.66 ^c	0.15
7 β -CN	32.95	0.10	27.45 ^a	0.11	27.14 ^b	0.03	22.22 ^c	0.22	21.74 ^d	0.03
8	0.70	0.18	2.31	0.23	1.94	0.00	1.39	0.26	1.81	0.04
9	2.76	0.16	1.13	0.11	0.84	0.13	1.09	0.02	0.96	0.15
10 α_{s2} -CN	10.25	0.67	7.95	0.09	8.31	0.63	7.04	0.91	5.71	0.22
11 α_{s1} -CN	31.57	0.72	14.36 ^a	0.40	16.18 ^b	0.36	17.12 ^c	0.24	16.64 ^{bc}	0.12
12	2.51	0.02	1.53	0.65	1.50	0.23	1.59	0.07	1.71	0.12
13 α_{s1} I-CN	0.43	0.01	18.85 ^a	0.88	17.75 ^b	0.36	16.22 ^c	0.36	15.88 ^c	0.37
14	0.52	0.09	0.23	0.01	0.21	0.03	0.22	0.06	0.23	0.02
15	0.45	0.06	0.28	0.03	0.22	0.01	0.22	0.00	0.21	0.00
16 prod hid	0.44	0.04	1.58	0.08	1.65	0.03	1.63	0.01	2.25	0.18
17 prod hid	0.69	0.02	2.65	0.51	2.64	0.70	4.15	0.54	4.83	0.12
18	1.27	0.15	0.14	0.08	0.21	0.02	0.27	0.11	0.18	0.02
19	1.02	0.24	0.09	0.03	0.11	0.00	0.42	0.20	0.21	0.00
20 prod hid	0.31	0.01	2.55	0.95	2.25	0.69	3.82	0.19	4.92	0.33
21	0.76	0.15	0.23	0.09	0.13	0.04	1.56	0.13	1.35	0.08
22	0.10	0.00	2.60	0.27	2.37	0.35	0.10	0.01	0.18	0.04
23 prod hid	0.12	0.01	1.07 ^a	0.18	0.93 ^a	0.23	0.17 ^b	0.08	0.18 ^b	0.02
24 prod hid	0.68	0.22	0.26 ^a	0.04	0.28 ^a	0.13	0.77 ^b	0.16	0.87 ^b	0.33

Relaciones										
$(\alpha_{s1}I / \alpha_{s1} + \alpha_{s1}I) \times 100$	1.34	0.03	56.76 ^a	0.72	52.31 ^b	1.00	48.65 ^c	0.83	48.83 ^c	0.66
$(\Sigma \gamma / \beta + \Sigma \gamma) \times 100$	0.24	0.01	30.38 ^a	0.94	31.46 ^a	1.26	41.36 ^b	0.60	42.20 ^b	0.89
$(\Sigma \gamma / \beta) \times 100$	31.59	1.26	43.64 ^a	0.79	45.91 ^a	0.83	70.39 ^b	0.27	73.00 ^c	1.32

*: la κ -caseína tiene el mismo frente de migración que la γ_3 -CN, de allí el alto valor obtenido para esta relación, cuando consideramos la leche.

Nota: los valores son promedio de muestras sembradas y leídas por cuadruplicado.

* El supraíndice indica la diferencia significativa entre la comparación de los distintos tiempos de cocción. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Los resultados presentados en la Tabla XVIII permiten observar que el efecto del tiempo de mantenimiento de la temperatura de trabajo en tina, impacta en forma diferente en la proteólisis de las distintas fracciones proteicas. Se observa una menor degradación de la α_{s1} I-caseína cuando se mantuvo la temperatura durante 40 minutos en tina debido probablemente a que las enzimas coagulantes, responsables de la hidrólisis de esta proteína, son termolábiles y se vieron afectadas por el mayor tiempo de calentamiento en los quesos tratados a 42 °C. En los quesos tratados a 54 °C, en cambio, debido a la inactivación inicial de estas enzimas a la temperatura de cocción, independientemente del tiempo, los resultados para ambos quesos resultaron similares y menores significativamente con respecto a los del Grupo 1.

En cuanto a la hidrólisis de la β -caseína cuya responsable principal es la plasmina, su degradación resultó mayor en quesos tratados durante 40 minutos. Estos resultados concuerdan con los presentados para la actividad de la PLM, que presentan valores mayores en los quesos que fueron cocidos durante 40 minutos (Tabla XVI). Sin embargo, estos resultados no son acompañados por las observaciones relacionadas con la relación de Nitrógeno Soluble a Nitrógeno Total cuyo valor resultó menor en quesos semicocidos a 42 °C durante 40 minutos y no presentó diferencias significativas para los quesos cocidos a 54 °C (Tabla XVII). En cuanto a la relación con la concentración retenida de la PLM, no se

observaron diferencias significativas entre los dos tiempos de calentamiento para ninguna de las dos tecnologías (Tabla XIV).

En la misma tabla, se observa una proteólisis significativamente superior en los quesos del Grupo 2 con respecto a los del Grupo 1 en lo que se refiere a las fracciones de la β y γ -caseínas. Esta observación está de acuerdo con las relaciones de NS/NT encontradas, y pueden atribuirse fundamentalmente al proceso de hidrólisis llevado a cabo por la plasmina y el tiempo de maduración más prolongado de 75 días para este grupo. La acción relacionada con la hidrólisis producida por las enzimas coagulantes y la batería enzimática de las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) fundamentalmente sobre la α s1-caseína, se mantienen invariables. Si bien la retención del par PLM/PLG es significativamente inferior en los quesos tratados a 54 °C, éste presenta un porcentaje de enzima activa de 55.45 mientras en los quesos semicocidos, el valor fue de 39.8 en promedio (Tabla XIV).

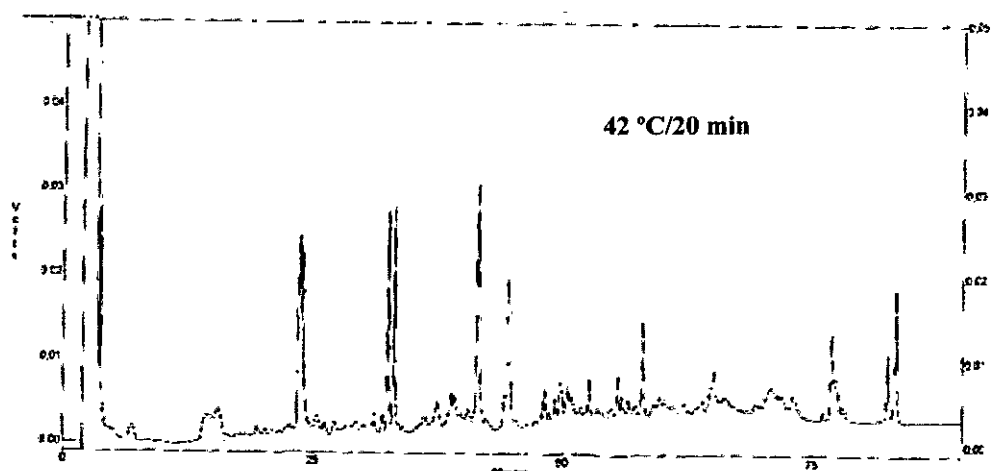
4.2.3.3. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN SOLUBLE A pH 4.4

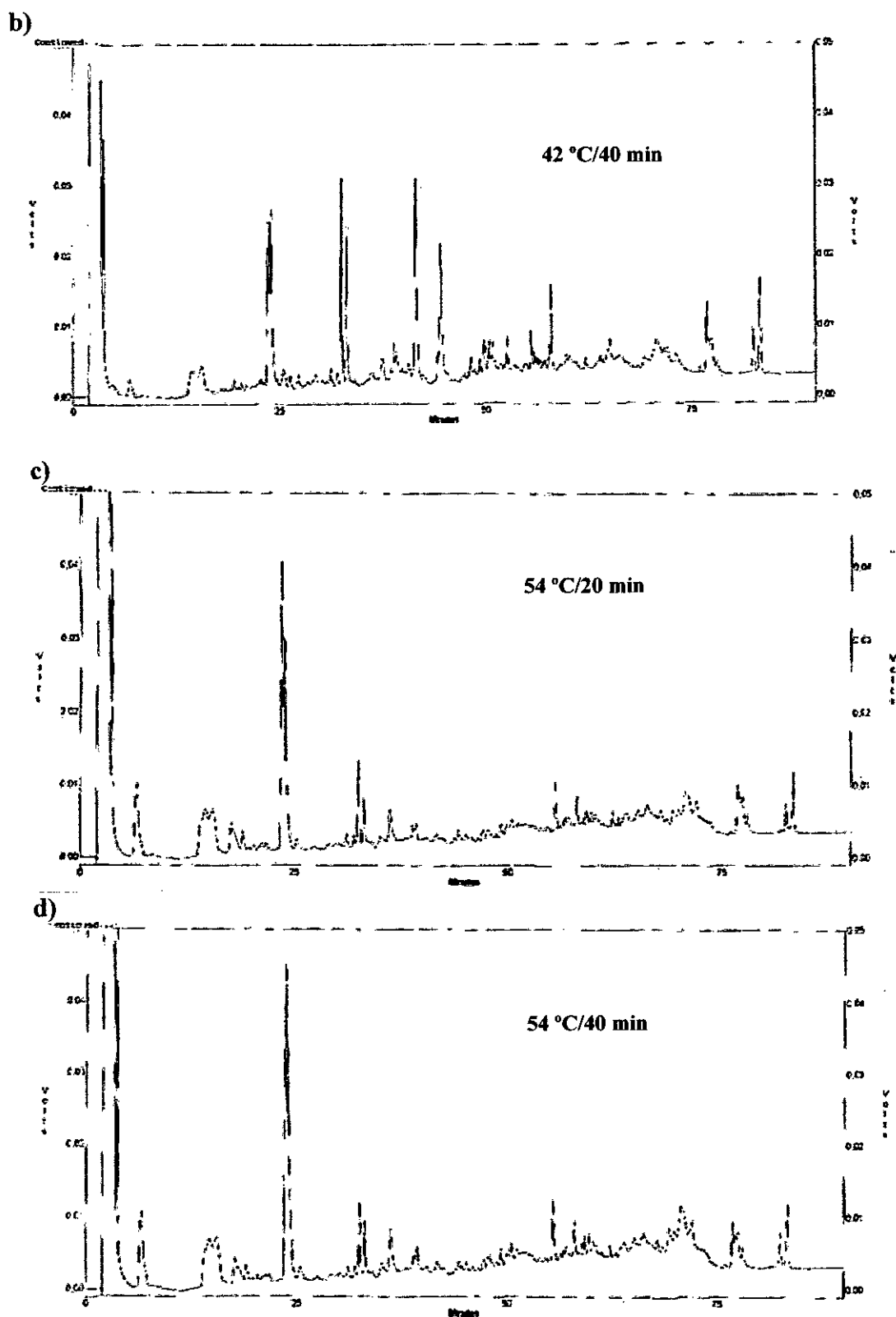
Se llevó a cabo el análisis de la fracción del Nitrógeno Soluble a pH 4.4, por RP-HPLC de los quesos al final de su período de maduración.

En la **Figura 27** se presenta una selección de los cromatogramas más representativos.

Figura 27: *cromatogramas RP-HPLC de los extractos solubles a pH 4.4 pertenecientes a los quesos elaborados a 42 y 54 °C de cocción con tiempos de mantenimiento de 20 y 40 minutos para cada una de las temperaturas, al final del período de maduración. a, b, c, d, correspondiente a 42/20, 42/40, 54/20 y 54/40 respectivamente.*

a)





Los cromatogramas muestran la similitud entre las fracciones correspondientes al nitrógeno soluble a pH 4.4 de los quesos sometidos a una misma temperatura y distinto tiempo de cocción. No se observaron diferencias cualitativas ni cuantitativas en los perfiles peptídicos de los quesos analizados.

Los perfiles obtenidos en este Ensayo, son comparables a los perfiles peptídicos observados en el Ensayo 1. Se pone de manifiesto, además, la diferencia entre las dos tecnologías empleadas, como lo habíamos informado previamente.

4.2.4 CONCLUSIONES

No se observaron diferencias significativas en la composición de los quesos madurados elaborados con los distintos tiempos de mantenimiento de la temperatura en la etapa de cocción.

Con respecto a la retención del par PLM/PLG en los quesos jóvenes, no se observaron diferencias significativas en los quesos que fueron sometidos a tiempos de cocción de 20 y 40 minutos a temperaturas de trabajo en tina de 42 y 54 °C respectivamente.

Con respecto a la actividad de la PLM y la derivada del PLG, concluimos que el tiempo de mantenimiento de la cocción, no tiene un efecto observable común a las dos tecnologías estudiadas. De acuerdo a los resultados presentados, los quesos del Grupo 1, mostraron mayor actividad de la PLM y derivada del PLG en los quesos cocidos durante 20 minutos, mientras que en el Grupo 2, el resultado obtenido fue inverso. En los quesos madurados, en todos los casos, la actividad de la PLM resultó mayor en los quesos tratados durante 40 minutos. La actividad derivada del PLG no presentó diferencias significativas en este caso.

No se observaron diferencias significativas en la diferencia de la relación porcentual de NS a Nitrógeno total a lo largo de la maduración entre los quesos sometidos a igual temperatura de trabajo en tina y distinto tiempo de mantenimiento.

Los perfiles electroforéticos y cromatográficos del nitrógeno soluble a pH 4.4 resultaron similares. Se observó diferencia en los indicadores de la proteólisis de la beta-caseína, resultando más proteolizados aquéllos que fueron calentados durante 40 minutos. En el caso de la α_{s1} -caseína se observó una menor degradación cuando se mantuvo la temperatura durante 40 minutos.

4.3. EFECTO DE LA TECNOLOGÍA DE ELABORACIÓN DE DISTINTAS VARIETADES DE QUESOS EN LA RETENCIÓN DEL PAR PLM-PLG Y EN LA ACTIVIDAD DE LA PLASMINA Y LA DERIVADA DE SU PRECURSOR, EL PLASMINÓGENO, EN LA PROTEOLISIS PRIMARIA DURANTE LA MADURACIÓN (ENSAYO 3).

Tomando como base distintas tecnologías de quesos prensados, prensados semi-cocidos y prensados cocidos, se incorporó al estudio el queso blanco. Ésta incorporación se basó en el interés que presentó la posibilidad de comparar tecnologías muy dispares entre sí, e incluir un queso no prensado y sin maduración.

El estudio se llevó a cabo en queso blanco untado, queso de pasta prensada no cocida tipo Saint Paulin y Por salut, de pasta cocida prensada del tipo Comté y quesos madurados en superficie del tipo Camembert. La elección de este tipo de quesos se basó en ser éstos representativos de una amplia variedad de quesos.

Las diferencias en las tecnologías empleadas se basan en algunas de las etapas de la fabricación, siendo sobresalientes los aspectos relacionados con 1) los fermentos utilizados para la acidificación, 2) las temperaturas de tratamiento de la cuajada, 3) la siembra en superficie (en el caso del tipo Camembert, por ejemplo), 4) la técnica de desuerado, prensado y 5) tiempo y condiciones de maduración como puede verse en las Cartas de fabricación 6 (*Ensayo 3*). Estas variaciones conducen a la obtención de quesos con características diferentes y con rendimientos de 35.7%, 13.4%, 10.9%, 8.3% para las variedades queso blanco untado, tipo camembert, prensado y prensado cocido respectivamente.

4.3.1. COMPOSICIÓN MAYORITARIA DE LOS QUESOS

Los quesos de cada tipo elaborados el mismo día fueron considerados duplicados ya que la materia prima fue regular a lo largo de todas las experiencias. La composición de los quesos jóvenes recién elaborados para el caso de los untados, de aquéllos salidos de salmuera previo encerado en el caso de los prensados y de los madurados cuando corresponda, se resumen en la **Tabla XIX**.

TABLA XIX: Composición físico-química de los quesos de distintas variedades utilizando las tecnologías correspondientes. Quesos jóvenes y madurados.

<i>Quesos jóvenes (20 hs)</i>						
Variedad	pH		Extracto seco		NT/ES	
			g % queso		g % ES	
	X	DE	X	DE	X	DE
Untable	4.36 ^{a,a}	0.06	20.68 ^{a,a}	0.47	5.50 ^{a,a}	0.35
Pasta blanda "mole"	4.95 ^{b,b}	0.02	45.24 ^{b,b}	0.11	6.36 ^{b,b}	0.06
Prensado no-cocido	5.18 ^{c,c}	0.00	50.77 ^{c,c}	0.13	6.76 ^{c,c}	0.08
Prensado cocido	5.41 ^{d,d}	0.00	62.34 ^{d,d}	0.11	6.84 ^{c,c}	0.01

<i>Quesos madurados (final período de maduración)</i>										
Variedad	pH		Extracto seco		NT/ES		NaCl		Materia grasa	
			g % queso		g % ES		g % ES		g% ES	
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
Untable	4.37 ^{a,a}	0.04	21.14 ^{a,a}	0.42	5.62 ^{a,a}	0.18	0.84 ^a	0.24	44.46 ^a	0.51
Pasta blanda "mole"	5.08 ^{b,e}	0.08	45.12 ^{b,b}	0.14	6.62 ^{b,d}	0.13	5.30 ^b	0.22	50.44 ^b	0.69
Prensado no-cocido	5.34 ^{c,f}	0.04	51.74 ^{c,e}	0.25	6.76 ^{b,c}	0.08	1.62 ^c	0.06	49.56 ^b	0.13
Prensado cocido	5.62 ^{d,g}	0.01	63.44 ^{d,f}	0.54	6.80 ^{b,c}	0.01	0.66 ^a	0.10	49.61 ^b	0.38

Nota: Promedio (X) y desvío standard (DE) de determinaciones realizadas por duplicado en muestras de cada una de los dos quesos elaborados en distintas tinas (n=4).

* El primer supraíndice indica la diferencia significativa entre la comparación de las distintas tecnologías. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes (P<0.05).

** El segundo supraíndice después de la coma, indica la comparación entre quesos jóvenes y madurados. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes (P<0.05).

Los resultados obtenidos para los quesos prensados no cocidos y prensados cocidos fueron semejantes a los observados para aquéllos tratados en el rango de 32-36 y 50-55 °C,

respectivamente (Tabla V) del *Ensayo 1* y a los fabricados a 54 °C del *Ensayo 2*. Ésto fue predecible debido a que se utilizaron tecnologías de elaboración, materia prima e ingredientes similares.

La relación Nitrógeno total/ Extracto seco presentó una tendencia creciente con la temperatura de cocción y los valores más altos se observaron en los quesos prensados cocidos, aún cuando las diferencias no fueron significativas. En cuanto al queso blanco untable, se observa un valor menor de la relación que el del tipo prensado tipo Camembert y no cocido. Este efecto puede explicarse porque el bajo pH del queso recién elaborado (4.48, Carta de fabricación 6) y la acidificación lenta del proceso, producen pérdida de proteosa peptona y péptidos en el suero. No se observaron diferencias significativas entre los quesos jóvenes y los “madurados” con excepción del caso del queso tipo Camembert. Este hecho está de acuerdo con el corto tiempo (6 días) de almacenamiento en cámara para el queso blanco y que el encerado previene los cambios por pérdida de humedad en los quesos prensados.

A lo largo del proceso de maduración, el pH insinuó una tendencia creciente como consecuencia de la proteólisis secundaria. El porcentaje de cloruro de sodio, resultó significativamente mayor en el caso de los quesos de pasta blanda “mole” tipo Camembert debido a que se trabajó con hormas de 250 g cada una y el tiempo de salado fue de 1 hora. A lo largo del ensayo, los valores que presentaron los parámetros composicionales estudiados, correspondieron a los rangos establecidos por la normativa para las variedades estudiadas.

El conjunto de los quesos recién elaborados pertenecientes a las cuatro variedades, pueden verse en las **Figuras 28 a 31**.

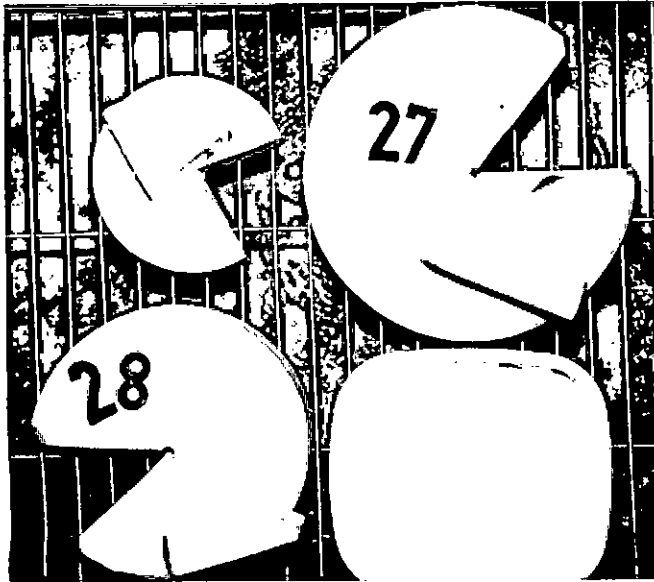


Figura 28. Queso tipo blanco untable.

Figura 29. Queso tipo Camembert.

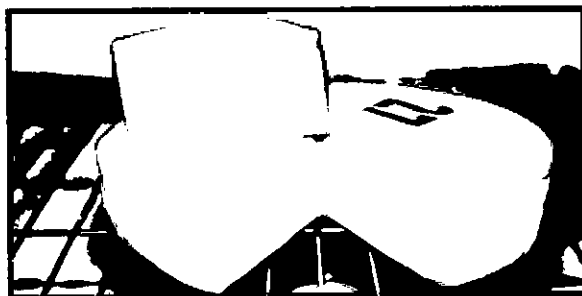


Figura 30. Queso tipo Saint Paulin

Figura 31. Queso tipo Comté.



Los quesos “madurados” se muestran en las Figuras 32 a 35



Figura 32. Quesos blanco untable, después de 4 días de almacenamiento en cámara a 4 °C.



Figura 33. Quesos de pasta prensada no cocida con maduración en superficie del tipo Camembert.

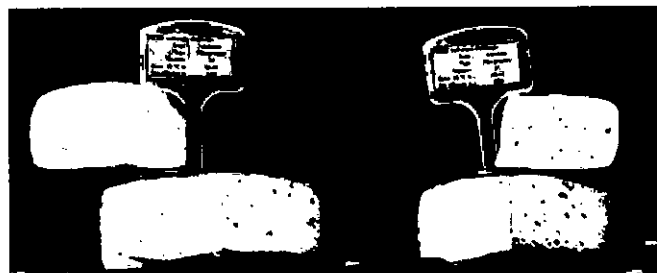


Figura 34. Quesos de pasta prensada no cocida del tipo Saint Paulin.

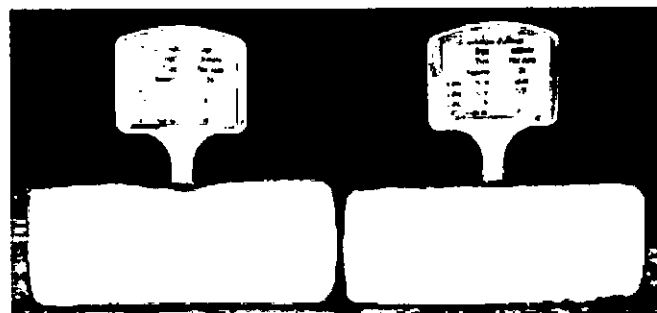


Figura 35. Quesos de pasta cocida prensada del tipo Comté.

4.3.2. RETENCIÓN DEL PAR PLASMINA/PLASMINÓGENO

4.3.2.1. CONCENTRACIÓN DE PLASMINA Y PLASMINÓGENO EN QUESO Y SUERO

Las concentraciones de la enzima Plasmina (PLM) y de su precursor el Plasminógeno (PLG) en queso, suero, y leche utilizada como materia prima, según los resultados obtenidos por el método ELISA, se resumen en la **Tabla XX**. Con el fin de poder comparar

y eliminar la variable de la humedad de la masa de los quesos, los resultados se expresaron en μg de PLM, PLG o del par PLM + PLG con respecto al extracto seco.

TABLA XX: *determinación ELISA de la concentración total de PLG + PLM y concentración del PLG en quesos jóvenes de distintas variedades.*

Variedad	QUESO						SUERO					
	PLG		PLG + PLM		PLM		PLG		PLG + PLM		PLM	
	(ug/g ES)				%		(ug/ml)				%	
	X	DE	X	DE	X		X	DE	X	DE	X	
Untable	6.38 ^a	0.16	12.52 ^a	0.98	6.14	49 ^a	0.86 ^a	0.05	1.63 ^a	0.17	0.77	48 ^a
Pasta blanda "mole"	8.35 ^b	0.61	21.11 ^b	1.90	12.76	60 ^b	0.18 ^b	0.04	0.39 ^b	0.03	0.21	53 ^b
Prensado no cocido	22.94 ^c	1.17	32.73 ^c	1.78	9.79	30 ^c	0.39 ^c	0.03	0.53 ^c	0.02	0.14	26 ^c
Prensado cocido	3.65 ^d	0.58	11.61 ^a	0.61	7.96	69 ^d	0.44 ^d	0.05	0.63 ^c	0.04	0.19	29 ^c
leche (ug/ml)	1.35	0.09	1.95	0.08	0.60	31						

Nota: los resultados mostrados en la Tabla XX corresponden al promedio (X) y desvío estándar (DE) de n=6 determinaciones para cada parámetro.

* El supraíndice indica la diferencia significativa entre la comparación de las distintas tecnologías. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes (P<0.05).

Nuestros resultados muestran diferencias significativas (p<0.05) en la retención del par PLM/PLG y la relación porcentual de la PLM con respecto al par PLM/PLG entre los quesos obtenidos por las distintas tecnologías empleadas.

La **Tabla XX** nos muestra que la retención del par enzimático en el extracto seco, es más baja para el caso de los quesos blanco untable y prensado cocido. En el primer caso, el suero presenta una concentración alta del par PLM/PLG. Podría deberse a la transferencia de la plasmina desde la micela caseínica al suero a pH menores de 5.00 (Fajardo-Lira et al. 2000). La concentración del par PLM/PLG retenida en la cuajada del queso tipo Camembert, resultó menor que en el caso del queso prensado no cocido a pesar de tener la misma temperatura de trabajo en tina. Este hecho podría ser explicado por la diversidad de fermentos utilizados en su fabricación y la adición de glucono-delta-lactona. Estos resultados concuerdan con los informados anteriormente por Dupont y Grappin (1998) para

quesos comerciales, donde encontraron valores de 26.4 $\mu\text{g/g}$ para queso Gouda y un promedio de 14 $\mu\text{g/g}$ para Camembert.

Los resultados presentados en la tabla anterior, nos permiten observar el descenso en la retención del par PLM/PLG en la cuajada cuando la tecnología empleada es la del queso de masa cocida prensada a la temperatura de 52 °C.

El porcentaje relativo de Plasmina con respecto al par PLM/PLG en el queso, resultó mayor en los quesos de pasta prensada cocida (69%) y en el tipo Camembert (60%). El hecho observado en el queso prensado cocido fue antes informado en los Ensayos 1 y 2 y se relacionan con la activación de la plasmina con la temperatura de cocción (Sommers y Kelly, 2002; Rampilli y Raja, 1998). En el caso del queso tipo Camembert, este alto porcentaje de activación podría deberse a la fermentación compleja que se lleva a cabo durante la fabricación del mismo. Estos resultados concuerdan con los informados por Dupont y Grappin (1998), quienes encontraron relaciones porcentuales de PLM con respecto al par PLM/PLG de 25%, 66%, 14% y 75% para los quesos comerciales Boursin (tipo blanco unttable), Camembert, Gouda y Comté respectivamente.

Los porcentajes relativos de PLM observados en queso y suero fueron similares entre sí para los quesos blanco unttable, tipo Camembert y de pasta prensada no cocida. El suero presentó valores de 98, 88 y 87% de PLM de aquél encontrado en los quesos jóvenes. En el caso del queso prensado cocido, en cambio, el % de PLM en suero representa el 42% del porcentaje en el queso joven. Este hecho podría deberse a 1) que el cambio conformacional que conduce a la transformación del PLG en PLM ha ocurrido durante el proceso de trabajo en el molde, prensado, salado y almacenamiento en cámara previo al encerado ó 2) que la plasmina es retenida preferencialmente con respecto a su zimógeno.

Los resultados que se muestran en la **Tabla XXI**, corresponden a las concentraciones de PLM y PLG en la masa total de los quesos jóvenes (queso blanco desuerado y salidos de salmuera) y en el suero correspondiente, considerando el volumen total del mismo después del desuerado.

TABLA XXI: Concentración total del par PLG + PLM en queso y suero considerando el peso del queso y el volumen de desuerado obtenidos para cada variedad de queso estudiada.

Variedad	Peso del queso		Concentración PLM+PLG			Recuperación
	(g)		Queso (mg)	Suero (mg)	Total (mg)	(%)
	<i>X</i>	<i>DE</i>				
Untable	4286.0	8.5	11.39	12.27	23.66 ^a	102
Pasta blanda "mole"	1450.1	29.3	13.85	3.94	17.79 ^b	77
Prensado no cocido	1265.0	52.2	21.02	5.53	26.55 ^c	112
Prensado cocido	972.2	36.8	7.26	6.75	14.01 ^d	60
Leche					23.18	

Nota: los resultados de la Tabla corresponden a promedios (*X*) y desvío estándar (*DE*) de tres mediciones realizados sobre dos quesos considerados replicados para cada característica (n=6).

* El supraíndice indica la diferencia significativa entre la comparación de las distintas tecnologías. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes (P<0.05).

De la evaluación de los resultados presentados en la tabla anterior, se observa que las concentraciones totales de PLM + PLG variaron significativamente (p<0.05) de acuerdo a la tecnología para las distintas variedades. Se observó una reducción brusca (del 42-52 %) en la recuperación de la concentración total presente en leche, en los quesos prensados cocidos a 52°C, con tecnología de tipo Comté, marcando nuevamente la tendencia observada en los Ensayos 1 y 2. La recuperación del complejo presentó valores cercanos a 100 % para los quesos prensados no cocidos y el queso blanco untable. El tipo Camembert presentó una recuperación del 77%.

Este efecto no puede ser explicado por el pH de elaboración, ya que en el caso del queso blanco, el pH en la cuajada fue menor y desfavorable para la retención del par enzimático. Sin embargo, la recuperación total fue del 102% ya que gran parte del mismo fue transferido al suero. A diferencia de los quesos de pasta prensada cocida, la temperatura de trabajo en tina es de 34 °C, temperatura a la cual no ocurren cambios conformacionales de los grupos tiol de la enzima ni desnaturalización parcial de la β-lactoglobulina. En cambio,

el efecto de la glucono-delta-lactona y los fermentos utilizados para la elaboración del Camembert, podrían ser la causa de la baja recuperación del par.

4.3.2.2. ACTIVIDAD DE PLASMINA Y DERIVADA DEL PLG

Las actividades correspondientes a la plasmina y a la derivada del plasminógeno, también fueron estudiadas. Los resultados obtenidos a lo largo de la maduración pueden verse en la **Tabla XXII**.

TABLA XXII: actividad de PLM y derivada del PLG en quesos jóvenes de 20 hs y madurados respectivamente según el método de detección espectrofotométrico.

Variedad	Actividad de PLM				Actividad derivada del PLG			
	20 hs		madurados		20 hs		madurados	
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
Untable	0,67 ^{a,a}	0,01	0,86 ^{a,b}	0,09	9,57 ^{a,a}	0,45	9,60 ^{a,a}	0,39
Pasta blanda "mole"	1,29 ^{b,b}	0,07	1,61 ^{b,c}	0,02	8,27 ^{b,b}	0,26	8,20 ^{b,b}	0,17
Prensado no cocido	1,86 ^{c,c}	0,01	2,09 ^{c,d}	0,02	9,84 ^{a,a}	0,09	8,97 ^{c,e}	0,36
Prensado cocido	1,12 ^{d,d}	0,17	0,88 ^{a,d}	0,17	2,78 ^{c,c}	0,07	2,36 ^{d,d}	0,04

Actividad potencial total				% PLM	
20 hs		madurados		20 hs	madurados
X	DE	X	DE		
10,24 ^{a,a}	0,46	10,47 ^{a,a}	0,30	6,54 ^{a,a}	8,21 ^{a,b}
9,56 ^{b,b}	0,33	9,80 ^{b,b}	0,19	13,50 ^{b,b}	16,43 ^{b,c}
11,70 ^{c,c}	0,08	11,06 ^{c,e}	0,33	15,90 ^{c,c}	18,90 ^{c,d}
3,90 ^{d,d}	0,10	3,23 ^{d,f}	0,21	28,72 ^{d,d}	27,24 ^{d,e}

* El primer supraíndice indica la diferencia significativa entre la comparación de las distintas tecnologías. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes (P<0.05).

** El segundo supraíndice después de la coma, indica la comparación entre quesos jóvenes y madurados. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes (P<0.05).

Los resultados presentados, muestran que la actividad de plasmina varía significativamente, aumentando del queso untable, camembert y queso tipo Saint Paulin, y decrece para el queso de masa cocida, concordando con los resultados encontrados en los Ensayos precedentes. La actividad derivada del PLG, no presenta diferencias significativas (p<0.05)

entre los quesos untable y de pasta no cocida. Muestra un descenso brusco cuando se trata de la tecnología de pasta prensada cocida tipo Comté.

Rampilli y Raja (1998), mencionan que las características que más afectan la actividad residual de la plasmina se relacionan con las condiciones de cocción y el pH de los quesos. Informan que los valores más bajos de la actividad de PLM se encuentran en quesos de pasta no cocida especialmente con bajos valores de pH. Los mismos autores mencionan que ocurren cambios en el sistema PLM/PLG durante el período de maduración.

Los resultados de la **Tabla XXII** muestran que la actividad de la PLM aumenta significativamente ($p < 0.05$) entre los quesos jóvenes y madurados para las variedades untable, tipo Camembert y pasta prensada. En el caso de los quesos de pasta prensada cocida tipo Comté, se observó un descenso de 1.12 a 0.88 Unidades enzimáticas en la actividad de la PLM que resultó no ser significativo. Fernández et al. (2005), observaron que la actividad de la plasmina exhibió diferencias significativas entre quesos comerciales de pasta cocida, semicocida y no cocida, obteniéndose los valores más altos para los quesos de pasta cocida. Atribuimos estas diferencias, al estudiar quesos comerciales en que no se conoce en detalle el tipo de fermentos y tecnología empleada.

La actividad potencial total (**Tabla XXII**) acompaña la tendencia de la concentración (**Tabla XXI**), y observamos valores de 10.47 y 11.06 Unidades/g de extracto seco para los quesos untable y prensados no cocidos, de 9.80 para el tipo Camembert y de 3.23 para los quesos de pasta cocida prensada, marcando el descenso de actividad total como ya fuera observado en los Ensayos anteriores. En cuanto al porcentaje relativo de actividad de PLM respecto al par PLM/PLG, éste es más alto para los quesos que fueron sometidos al proceso de cocción de la cuajada, como ya fuera mencionado anteriormente para la concentración (**Tabla XX**).

Los resultados de la **Tabla XXII** muestran que no hay cambios significativos en la actividad potencial total de los quesos de tipo untable y Camembert durante la maduración. En cambio, hay una disminución significativa para los quesos prensados no cocidos y los de pasta prensada cocida. Ginzinger et al. (1999), Bastian et al (1997), Turi et al. (1997), Song et al (1993), Ollikainen et al (1988) entre otros observaron que el nivel de actividad de PLM disminuía gradualmente a lo largo del período de maduración. En otro estudio,

Fernández et al. (2005), observaron un incremento en la actividad de la PLM durante la maduración de un queso de pasta prensada cocida de tipo experimental, atribuyéndolo a la activación del PLG en la masa.

Antonsson et al (2003) mostraron variación en la actividad de la plasmina entre quesos de pasta semi-dura elaborados en distintos establecimientos. Esto concuerda con nuestros resultados, en los que hemos puesto en evidencia que la actividad de la enzima está íntimamente relacionada con la tecnología empleada y no es conveniente, por lo tanto, generalizar.

Los resultados mostrados en la **Tabla XXIII** representan las diferencias de concentración y actividad de la PLM en los quesos jóvenes, al comienzo de la maduración y al final de la misma.

Tabla XXIII: diferencia de concentración y actividad de PLM entre el final y comienzo de la maduración.

Variedad	Concentración de PLM µg/g ES				Actividad de PLM Unidades/g				Diferencia de	
	20 hs		madurados		20 hs		madurados		Concentra- ción	Actividad
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE		
Untable	2.62 ^{a,a}	0.05	3.00 ^{a,a}	0.32	0,67 ^{a,a}	0.01	0,86 ^{a,b}	0.09	0.38 ^a	0.19 ^{ab}
Pasta blanda "mole"	9.47 ^{b,b}	0,05	13,62 ^{b,c}	0,34	1,29 ^{b,b}	0,07	1,61 ^{b,c}	0,02	4.15 ^b	0.32 ^b
Prensado no cocido	12.34 ^{c,c}	0.08	11.50 ^{c,f}	0.28	1,86 ^{c,c}	0,01	2,09 ^{c,f}	0,02	-0.84 ^c	0.23 ^b
Prensado cocido	4.70 ^{d,d}	0,17	4.40 ^{d,f}	0.15	1,12 ^{d,d}	0,17	0,88 ^{a,d}	0,17	-0.30 ^c	-0.24 ^a

* El primer supraíndice indica la diferencia significativa entre la comparación de las distintas tecnologías. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes (P<0.05).

** El segundo supraíndice después de la coma, indica la comparación entre quesos jóvenes y madurados. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes (P<0.05).

Estos resultados nos permiten observar que no siempre el aumento de la actividad durante la maduración, va acompañado por cambios conformacionales del Plasminógeno para transformarse en PLM. Éste es el caso del queso prensado tipo Saint Paulin en el cual la concentración de PLM disminuyó y la actividad se incrementó significativamente en 0.23

unidades/g durante la maduración. Esto puede explicarse como una activación de la PLM pre-existente.

En el queso tipo Camembert la diferencia de concentración de PLM en quesos madurados con respecto a los quesos jóvenes es importante (4.15 µg/g ES). Este aumento, sin embargo, no se ve reflejado cuantitativamente en la actividad. Ésta aumentó significativamente 0.32 unidades a lo largo de la maduración. Esto indicaría que no toda la PLM se encuentra activa.

4.3.3. INDICADORES DE LA PROTEOLISIS PRIMARIA Y SECUNDARIA

4.3.3.1. EVALUACIÓN DE LA FRACCIÓN NITROGENADA

Los resultados obtenidos para la relación Nitrógeno soluble/ Nitrógeno total se muestran en la **Tabla XXIV**.

TABLA XXIV: *nitrógeno soluble a pH 4.4 como porcentaje (%) del Nitrógeno total al comienzo y final de la maduración y la diferencia entre ambos valores.*

Variedad	NS/NT x 100				
	quesos jóvenes		quesos madurados		Diferencias
	X	DE	X	DE	
untable	13.87 ^{a,a}	2.10	14.26 ^{a,a}	0.86	0.39
Pasta blanda "mole"	6.29 ^{b,b}	0.73	14.69 ^{a,c}	0.93	8.40
Prensado no-cocido	5.10 ^{cd,c}	0.10	18.88 ^{b,f}	0.29	13.78
Prensado cocido	3.66 ^{d,d}	0.17	11.26 ^{c,g}	0.08	7.60

Nota: Promedio (X) y desviación standard (DE) de 2 determinaciones realizadas por duplicado en muestras de cada una de los dos quesos elaborados en 2 distintas tinas en días sucesivos (n=4).

* El primer supraíndice indica la diferencia significativa entre la comparación de las distintas tecnologías. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes (P<0.05).

** El segundo supraíndice después de la coma, indica la comparación entre quesos jóvenes y madurados. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes (P<0.05).

Las variedades de quesos estudiadas presentaron relaciones porcentuales de Nitrógeno Soluble diferentes significativamente ($p < 0.05$), indicando que los procesos de proteólisis ocurren con diferente intensidad.

Los valores del porcentaje relativo de Nitrógeno Soluble en los quesos prensados no cocidos y cocido jóvenes concuerdan con los valores obtenidos anteriormente en el *Ensayo 1* para los quesos elaborados a 32 y 50 °C respectivamente. Sin embargo, si bien el primero sufrió un aumento del nitrógeno soluble acorde con el informado en la **Tabla X (Ensayo 1)** y cuya diferencia fue de 12.0% en ese caso y de 13.78% en el actual, el comportamiento de la proteólisis durante la maduración de los quesos prensados cocidos fue significativamente menor en el presente caso, obteniendo diferencias de 7.60% contra 12.6% del ensayo anterior.

En cuanto al queso blanco untado, el alto porcentaje de nitrógeno soluble respecto del total en los quesos jóvenes, se explica por el suero retenido en la cuajada y se compadece con el rendimiento (35.7%) y humedad resultantes para este tipo de tecnologías. La escasa proteólisis durante la “maduración” se debe al corto tiempo de almacenamiento (6 días a 4°C) así como el pH desfavorable para la actividad de las enzimas proteolíticas provenientes de las bacterias ácido lácticas presentes. Adicionalmente, es un queso con muy baja concentración de coagulante utilizado para la coagulación y por lo tanto la acción del mismo es leve. Por lo expuesto, observamos que, si bien la relación es alta, es un queso con muy baja proteólisis.

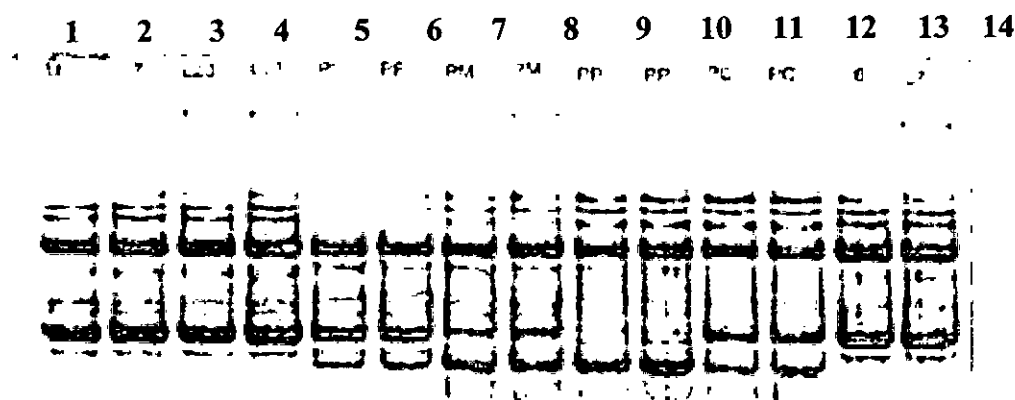
El queso tipo Camembert fue estudiado luego del período de maduración mínimo para observar el crecimiento de mohos en superficie y en el cual la proteólisis aún no fuera evidente sensorialmente con cambios de color y textura en la pasta. Este queso sufre, durante su maduración una proteólisis desde el exterior hacia el interior y puede estudiarse en distintos momentos de la misma. En nuestro estudio, este queso presentó una proteólisis pronunciada.

4.3.3.2. DEGRADACIÓN DE LA FRACCIÓN CASEÍNICA

Se evaluó el efecto de la actividad del coagulante y la plasmina en la proteólisis durante la maduración de los quesos de distintas variedades. La metodología utilizada para evaluarlo, fue la electroforesis en geles verticales de poliacrilamida-urea, y los quesos fueron analizados al final del período de maduración.

En la **Figura 36**, puede verse la corrida electroforética correspondiente a las fracciones caseínicas de los quesos experimentales correspondientes a distintas variedades: blanco untable, tipo Camembert, pasta prensada no cocida y pasta prensada cocida.

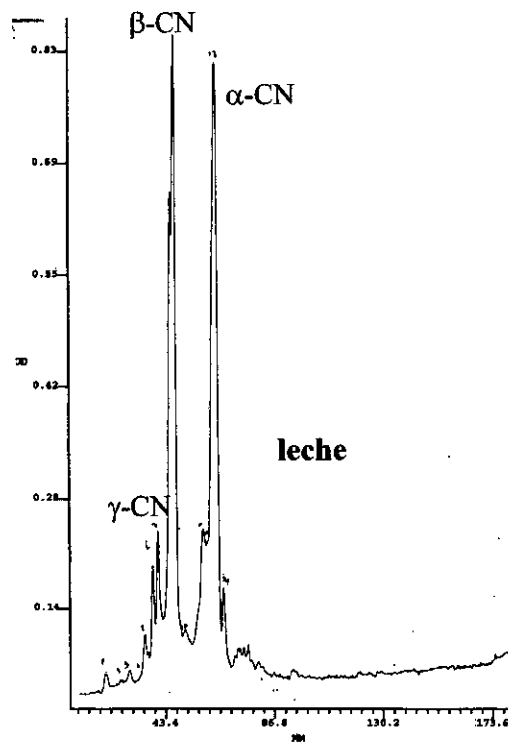
Figura 36: Urea-PAGE (T 12%, C 4%) de los quesos elaborados según el protocolo correspondiente y con distintas tecnologías. *Calles 1, 2, 3, 4, 13 y 14:* leche de partida, *calles 5 y 6:* queso blanco untable, *calles 7 y 8:* quesos pasta blanda “mole”, *calles 9 y 10:* quesos prensados no cocidos, *calles 11 y 12:* quesos prensados cocidos al final de los respectivos tiempos de maduración.

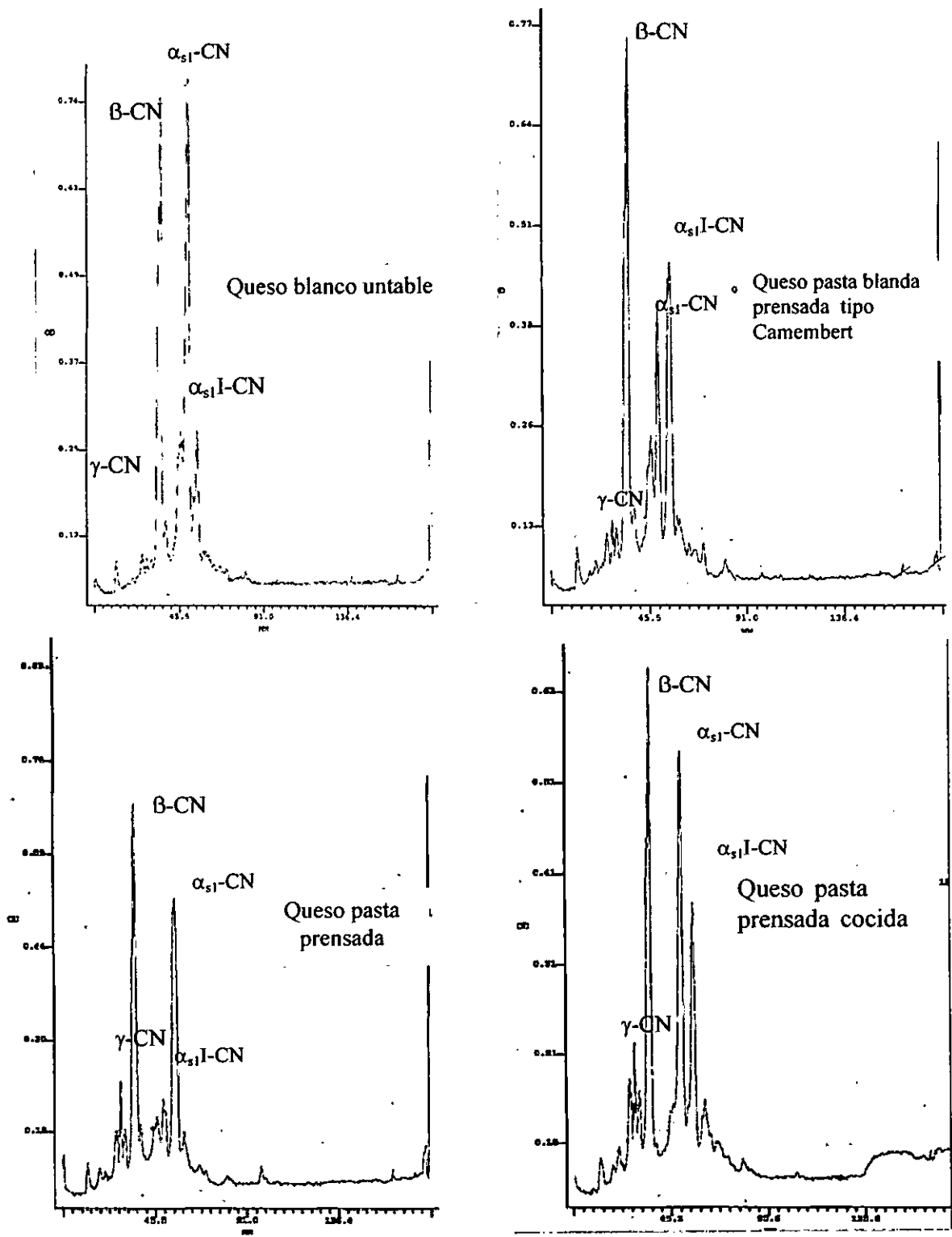


**Ensayo 3. Distintas tecnologías.
Leche y quesos “madurados”.**

La asignación de los picos considerados para la estimación de la proteólisis, son los mismos que para los Ensayos 1 y 2. Pueden verse algunos de los registros representativos en la **Figura 34**.

Figura 37: registros pertenecientes al Ensayo 3. Fracción insoluble a pH 4.4 de: a) leche, b) queso blanco untable, c) queso pasta blanda “mole”, d) queso prensado no cocido y e) queso prensado cocido.





Las áreas relativas de los picos correspondientes a las distintas fracciones caseínicas, se presentan en la **Tabla XXV**.

Tabla XXV: áreas relativas de los picos correspondientes a las distintas fracciones caseínicas y las siguientes relaciones como indicadores de la proteólisis: $(\alpha_{s1I} / \alpha_{s1} + \alpha_{s1I}) \times 100$, $(\sum \gamma / \beta + \sum \gamma) \times 100$ y $(\sum \gamma / \beta) \times 100$, de los quesos de distintas variedades, de acuerdo a la lectura densitométrica de las bandas obtenidas. Promedio (X) y desvío estándar (DE) obtenido a partir de la lectura de cuatro calles, n=4.

Fracciones	LECHE		Untable		Pasta blanda		PRENSADA no cocida		PRENSADA cocida	
	Área relativa (%)		Área relativa (%)		Área relativa (%)		Área relativa (%)		Área relativa (%)	
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
1	1.755	0.164	1.417	0.112	1.633	0.157	1.513	0.112	1.218	0.212
2	0.355	0.017	0.255	0.085	0.353	0.021	0.998	0.264	0.728	0.234
3	0.415	0.133	0.335	0.119	0.490	0.042	0.630	0.090	1.573	0.238
4 γ_2 -CN	2.030	0.381	1.725 ^a	0.174	2.165 ^{ab}	0.387	3.200 ^b	0.348	4.405 ^c	0.410
5 γ_1 -CN	2.390	0.162	0.853 ^a	0.180	1.588 ^a	0.186	4.043 ^b	0.319	3.318 ^b	0.370
6 γ_3 -CN	4.610	0.162	1.228 ^a	0.082	2.043 ^b	0.054	2.928 ^c	0.293	3.158 ^c	0.336
7 β -CN	32.685	0.976	26.715 ^{ab}	2.599	28.203 ^a	1.762	25.500 ^{ab}	2.138	24.470 ^b	0.901
8	0.825	0.133	2.943	0.290	2.953	0.322	3.650	0.411	1.410	0.206
9	2.580	0.416	0.495	0.049	1.055	0.231	1.323	0.209	1.043	0.171
10	9.310	0.878	13.810	1.059	11.693	1.523	8.205	1.077	5.067	0.692
11 α_{s1} -CN	34.075	0.941	29.343 ^a	2.715	13.450 ^b	1.548	7.368 ^c	0.660	21.050 ^d	2.466
12	2.635	0.329	2.750	0.298	1.185	0.238	1.330	0.158	1.463	0.143
13 α_{s1I} -CN	0.410	0.069	6.418 ^a	0.626	17.308 ^b	1.410	23.203 ^c	1.692	11.810 ^d	1.615
14	0.445	0.064	0.925	0.159	0.177	0.015	0.290	0.091	0.223	0.097
15	0.425	0.006	0.588	0.078	0.185	0.081	0.373	0.013	0.220	0.041
16	0.385	0.156	0.958	0.151	1.240	0.112	1.428	0.319	1.528	0.122
17	0.575	0.121	0.620	0.116	1.793	0.126	2.998	0.383	3.283	0.314
18	0.890	0.115	0.770	0.115	1.197	0.240	0.485	0.118	0.505	0.035
19	0.915	0.260	1.263	0.395	1.453	0.287	0.445	0.158	0.455	0.124
20	0.180	0.058	0.567	0.067	2.430	0.083	2.933	0.456	4.015	0.305
21	0.835	0.283	1.540	0.251	0.260	0.052	0.245	0.093	0.203	0.119
22	0.285	0.052	0.405	0.063	1.408	0.096	1.625	0.025	1.495	0.069
23 prod hid	0.200	0.046	0.173 ^a	0.071	1.853 ^b	0.316	1.623 ^c	0.160	0.183 ^a	0.032
24 prod hid	0.865	0.237	0.190 ^a	0.018	0.263 ^{ab}	0.035	0.428 ^b	0.029	1.103 ^c	0.259
25			0.377	0.183						
Relaciones										
$(\alpha_{s1I} / \alpha_{s1} + \alpha_{s1I}) \times 100$	1.19	0.02	17.95 ^a	1.65	56.27 ^b	1.48	75.90 ^c	1.18	35.94 ^d	2.04
$(\sum \gamma / \beta + \sum \gamma) \times 100$	21.65	1.38	12.47 ^a	0.76	17.05 ^b	0.60	28.51 ^c	0.77	30.78 ^d	0.50
$(\sum \gamma / \beta) \times 100$	27.60	0.42	14.25 ^a	1.38	15.04 ^a	0.94	39.88 ^b	1.67	44.47 ^c	1.64

Nota: a) los valores son promedio demuestras sembradas y leídas por cuadruplicado.

b) la κ -caseína tiene el mismo frente de migración que la γ_3 -CN, de allí el alto valor obtenido para esta relación, cuando consideramos la leche.

* El supraíndice indica la diferencia significativa entre la comparación de las distintas tecnologías. Los promedios que no presentan letras iguales son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

La tecnología utilizada presenta un efecto significativo sobre las fracciones γ_2 , γ_1 , γ_3 , productos de hidrólisis de la β -CN (bandas 8 y 10), α_{s1} -CN, 12, α_{s1} I-CN y productos de hidrólisis de la α_{s1} -CN (bandas 23 y 24) ($p < 0.001$), de la β -CN ($p < 0.01$) y de otras fracciones como la 2, y 22 ($p < 0.05$).

De la evaluación de estos resultados aparece claramente que la hidrólisis de la α_{s1} -caseína, indicador de la actividad de la quimosina y expresada por la relación $(\alpha_{s1}I / \alpha_{s1} + \alpha_{s1}I) \times 100$, es muy fuerte en los quesos de pasta prensada tipo Saint Paulin, en un grado medio en los de tipo Camembert mientras que su actividad es reducida en los quesos de pasta prensada cocida tipo Comté. Este efecto es motivado por la desnaturalización de la enzima por la temperatura de cocción (Sommers y Kelly, 2002; Addeo et al. 1997; Fox y McSweeney, 1996). En los quesos untables, la proteólisis fue muy débil debido fundamentalmente al pH poco favorable, a la baja concentración de coagulante utilizada y al tiempo de “maduración” reducido. Esta observación está de acuerdo con los valores de NS/NT encontradas.

En términos generales, las fracciones γ_2 -CN, γ_1 -CN y γ_3 -CN presentaron diferencias significativas entre las variedades de quesos estudiados. Se observó una tendencia creciente a medida que estudiamos los quesos blanco untable, tipo Camembert, pasta prensada no cocido tipo Saint Paulin y cocidos tipo Comté. Ésto implica que la proteólisis derivada de la acción de la plasmina y expresada por las relaciones $(\Sigma \gamma / \beta + \Sigma \gamma) \times 100$ y $(\Sigma \gamma / \beta) \times 100$ resultó mayor en los quesos prensados cocidos. Si bien éstos corresponden a los quesos con menor concentración de PLM y PLG retenido (Tabla XXII), la enzima se mantiene activa durante un período de maduración más prolongado.

Paralelamente a estas observaciones sobre las fracciones caseínicas identificadas, resulta interesante la observación de ciertas bandas no identificadas.

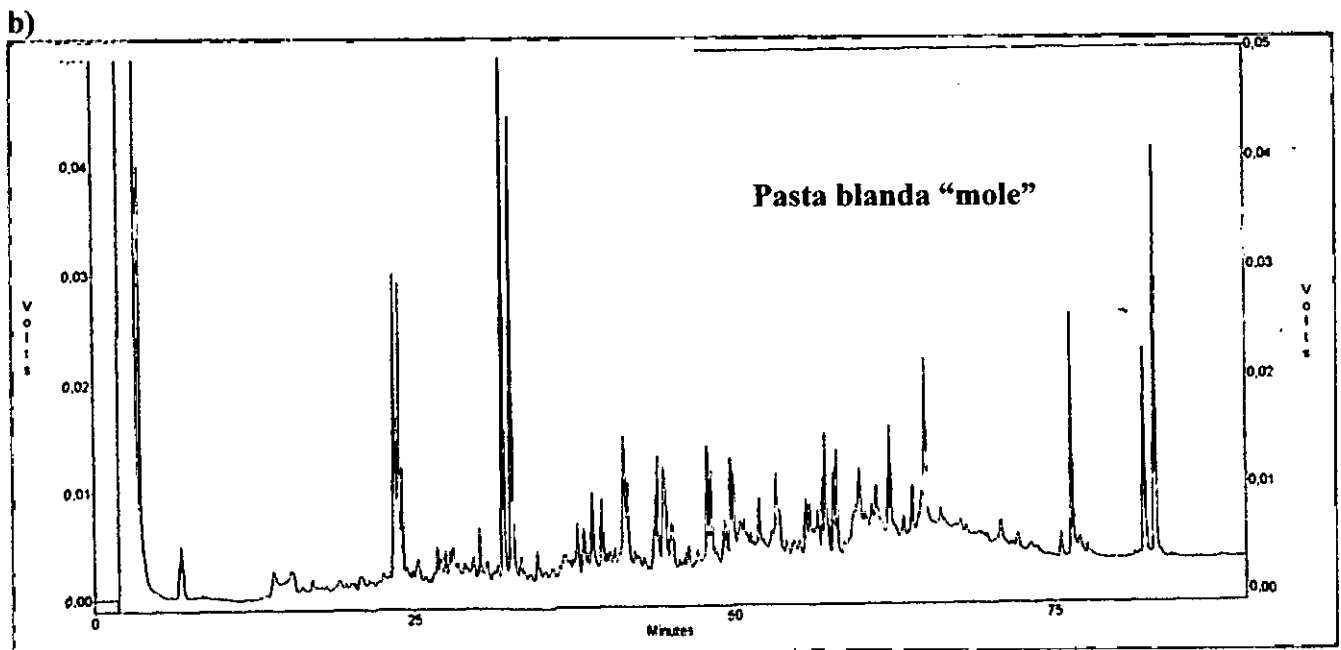
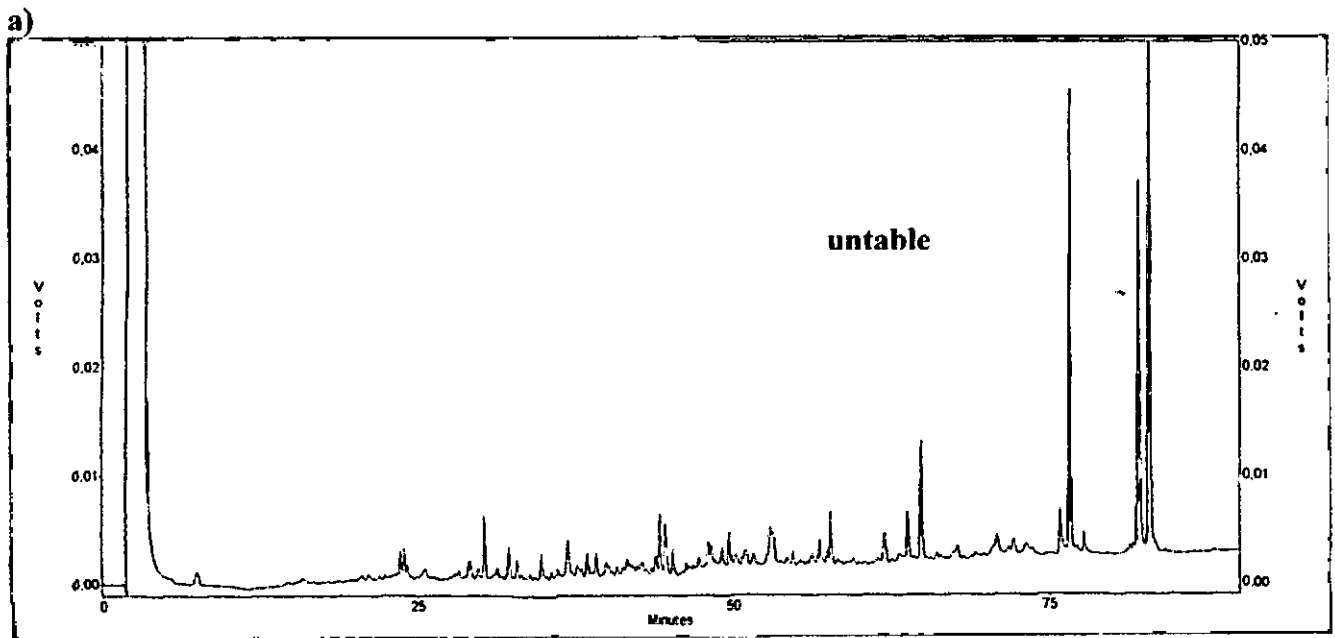
- La fracción 21 es significativamente ($p < 0.05$) más importante en los quesos de pasta prensada cocida que en las otras tecnologías. En los mismos, el porcentaje de esta fracción parecería aumentar gradualmente con las diversas tecnologías.
- Las fracciones 22 y 23 representan un porcentaje mayor en los quesos prensados y tipo Camembert que en los de tipo untable y pasta cocida. Esto nos permite inferir que se trata de compuestos de hidrolisis obtenidos por la acción de la quimosina (como la α_{11} -caseína).
- Las fracciones 20 y 24 están presentes en las distintas tecnologías de manera similar a las γ -caseínas y podrían provenir, por lo tanto, de la acción de la plasmina.
- La actividad de la plasmina antes de la maduración traducida en el aumento de las γ -caseínas y la disminución de la β -caseína, aumenta de forma significativa a medida que nos acercamos a la tecnología de pasta prensada cocida dando como resultado que el queso untable presenta menor actividad que el tipo Camembert, y éste menor que el de pasta prensada tipo Saint Paulin y éste menor que el de pasta prensada cocida tipo Comté. Esta clasificación debería encontrarse igualmente durante el período de maduración ya que la duración del mismo también aumenta.

4.3.3.3. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN SOLUBLE A pH 4.4

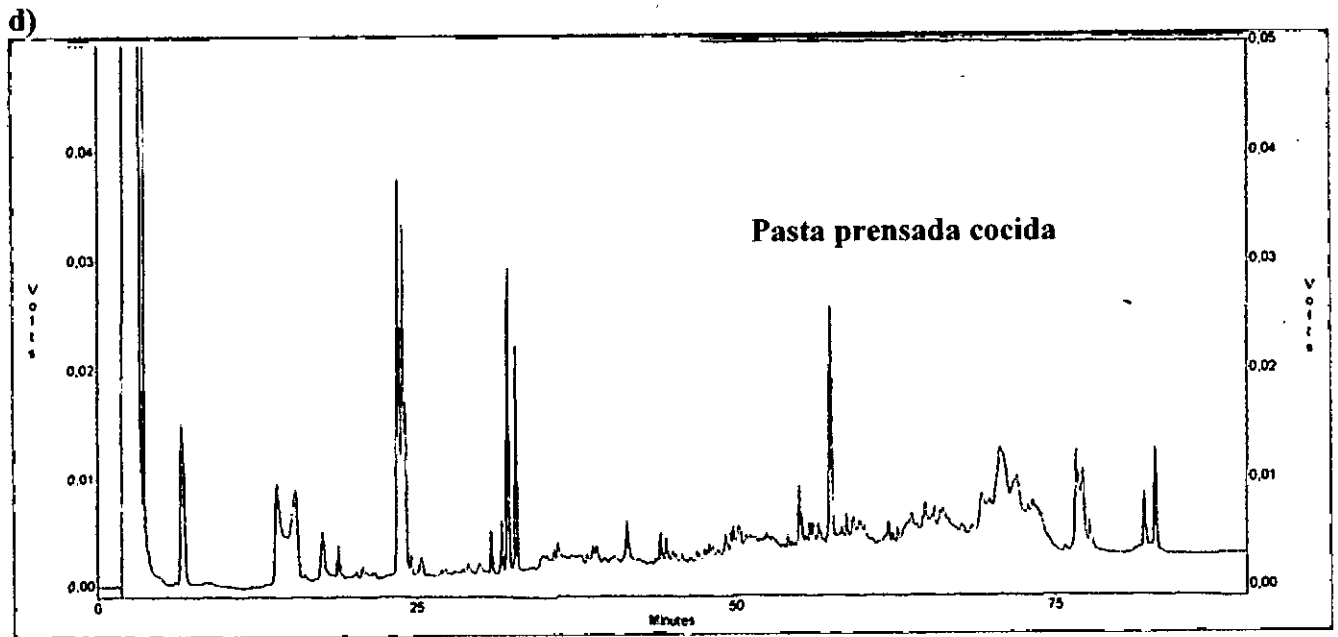
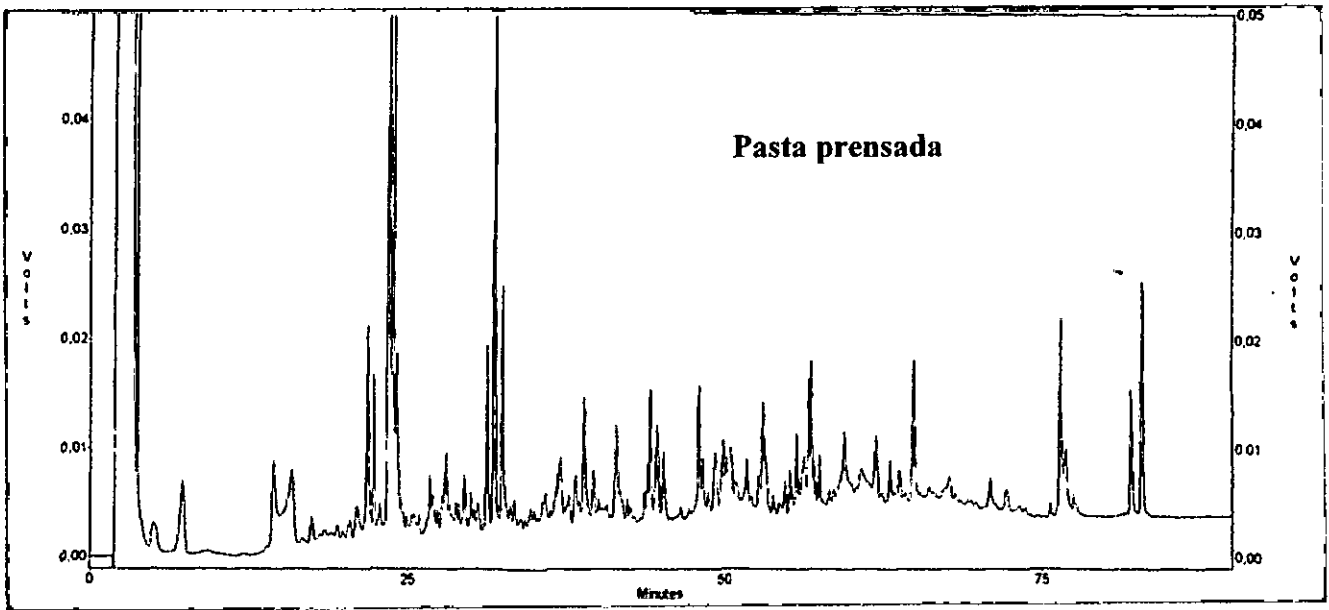
Se llevó a cabo el análisis de la fracción del Nitrógeno Soluble a pH 4.4, por RP-HPLC de los quesos al final de su período de maduración.

En la **Figura 38** se presenta una selección de los cromatogramas más representativos.

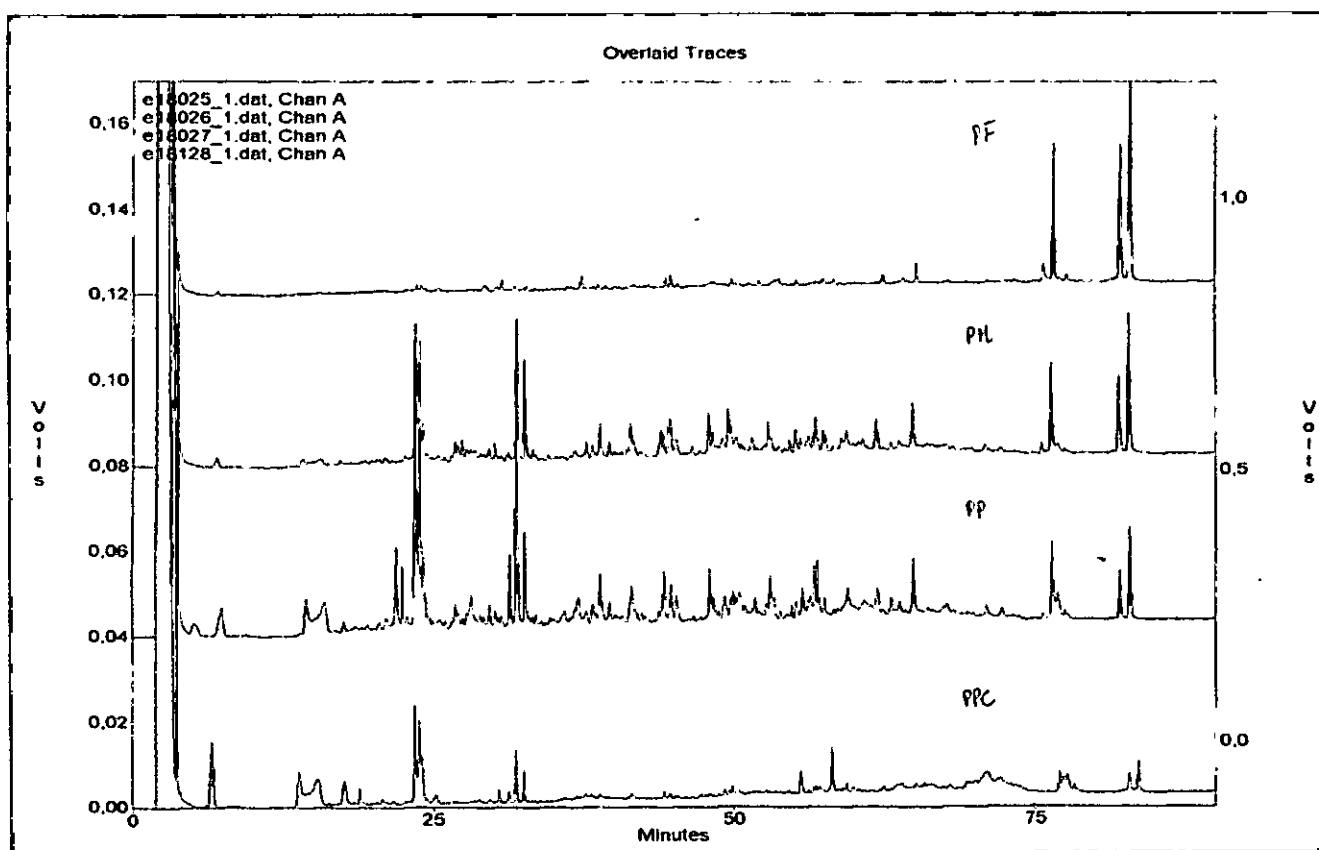
Figura 38: cromatogramas RP-HPLC de los extractos solubles a pH 4.4 pertenecientes a los quesos elaborados empleando distintas tecnologías, al final del período de maduración. Extractos a, b, c, d, correspondiente a queso blanco untable, queso pasta blanda “mole”, queso pasta prensada tipo Saint Paulin y queso de pasta prensada cocida tipo Comté respectivamente.



c)



Para una mejor comparación de los perfiles del Nitrógeno soluble a pH 4.4, se presentan en esta misma figura, el registro superpuesto de las cuatro tecnologías:



Los cromatogramas muestran diferencias cuali y cuantitativas entre los extractos pertenecientes a las distintas tecnologías. En los quesos del tipo untado se observa una baja concentración de péptidos originados por la proteólisis. Queda retenida, sin embargo, una alta concentración de beta y alfa lactoglobulinas, lo que nos permite explicar la relación porcentual de NS/NT similar al queso tipo Camembert.

En cuanto al perfil peptídico relacionado con la tecnología del Camembert, se observa una gran cantidad de péptidos eluidos entre los 20 y 50 minutos que demuestran la fermentación compleja de este tipo de productos. Se observan, sin embargo, péptidos comunes con el queso de pasta prensada y prensada cocida, provenientes muy probablemente, de la hidrólisis de la α_{s1} -CN por la quimosina. Por comparación del perfil peptídico con otros autores (McSweeney, 2004) inferimos que se trata de las lactocepinas, fragmentos f1-9 y f1-13 de la α_{s1} -CN. Ésto estaría de acuerdo con los valores encontrados en la Tabla XXIV para las fracciones 14 a 22.

Los perfiles peptídicos obtenidos en este Ensayo para el queso tipo Saint Paulin y Comté, son comparables a los observados en el Ensayo 1 para los quesos elaborados a 32 °C (Grupo 1) y a 50-55 °C (Grupo 2). Los perfiles peptídicos obtenidos de la fracción soluble

del queso tipo Saint Paulin, presenta los péptidos cuantitativamente más importantes. Ésto concuerda con el valor encontrado para la relación porcentual de NS a NT de 18.88 que resultó ser la mayor para todas las tecnologías.

Como observamos en el Ensayo 1, los extractos pertenecientes al queso tipo Comté se caracterizan por presentar un perfil cualitativamente similar al anterior, pero muy disminuido en el área, hecho que fuera tratado anteriormente. Adicionalmente, podríamos pensar que una parte de los péptidos fueron aún más profundamente hidrolizados a aminoácidos y péptidos menores que no vemos en estos cromatogramas.

4.3.4. CONCLUSIONES

La composición mayoritaria de los quesos madurados elaborados con distintas tecnologías correspondió a la propia de cada tipo.

En los quesos jóvenes, se observaron diferencias significativas en la retención del par PLM/PLG obteniéndose valores mayores en los quesos tipo Camembert y Saint Paulin. Los porcentajes relativos de PLM fueron mayores para los casos del queso tipo Camembert y Comté con valores de 60-70%. En los casos de quesos untable, Saint Paulin y Camembert, el porcentaje relativo de PLM fue similar en el queso joven y el suero indicando que no hubo transformación conformacional durante el período de elaboración, prensado y salado de los quesos (en caso de corresponder este paso). En cambio en el queso de pasta prensado cocido, hay un incremento de la relación porcentual de PLM respecto del par PLM/PLG de 29% en el suero a 69% en el queso joven. La transformación conformacional ocurrió durante los pasos de la elaboración antes mencionado. (**Tabla XXI**)

La actividad de la PLM y la derivada del PLG, mostraron diferencias significativas entre los quesos jóvenes y madurados de las distintas tecnologías y de los porcentajes de actividad de PLM con respecto al total. Se observa que el porcenje relativo más alto se da para los quesos de pasta cocida prensada madurados. Este porcentaje es de algo menos de 30%. Ésto indica que no toda la PLM disponible se encuentra activa (**TablaXXIII**). Se informa, como en los Ensayos anteriores, la disminución brusca de actividad para el caso de los quesos de pasta prensada cocida .

Los perfiles electroforéticos y cromatográficos del nitrógeno soluble a pH 4.6 resultaron diferentes significativamente. Se observaron diferencias significativas en los indicadores de la proteólisis de la beta-caseína resultando más proteolizados aquéllos que corresponden a quesos de pasta prensada cocida tipo Comté. Con respecto a la hidrólisis de la α_{s1} -caseína, los más proteolizados resultaron aquéllos que corresponden a quesos de pasta prensada tipo Saint Paulin y Camembert (**Tabla XXV**).

4.4. ESTUDIO DE LA ACCIÓN DE LAS ENZIMAS PLASMINA Y QUIMOSINA DURANTE LAS DISTINTAS ETAPAS DE LA ELABORACIÓN Y LA MADURACIÓN DE DISTINTAS VARIEDADES DE QUESOS (ENSAYO 4).

4.4.1 INDICADORES DE LA PROTEOLISIS

4.4.1.1. DEGRADACIÓN DE LA FRACCIÓN CASEÍNICA

Se evaluó el efecto de la actividad del coagulante y de la plasmina en la proteolisis durante las distintas etapas de la elaboración y hasta el final de la maduración de los quesos de distintas variedades. El objetivo fue conocer en qué momento se produce la acción de estas enzimas.

Los quesos fueron analizados en distintas etapas de la elaboración.. Con este objetivo se tomaron muestras de la leche materia prima, la cuajada, la cuajada en el momento del desuerado, el queso joven y el queso madurado. Adicionalmente, se tomaron muestras del suero obtenido durante el desuerado para evaluar su perfil proteico por medio de la electroforesis.

En las **Figuras 39 y 40**, pueden verse las corridas electroforéticas correspondientes a las fracciones caseínicas de las distintas etapas de cuajada, cuajada durante el desuerado, queso joven (20hs) y madurado, suero y leche materia prima durante la elaboración de los quesos experimentales de distintas variedades: blanco untable, tipo Camembert, pasta prensada no cocida tipo Saint Paulin y pasta prensada cocida tipo Comté.

Figura 39: Urea-PAGE de los etapas de elaboración de quesos experimentales correspondiente a queso blanco untable y queso tipo Camembert. *Calles 1, 7 y 13:* leche de partida, *calles 2, 3, 4, 5 y 6:* queso blanco untable, *calles 8, 9, 10, 11 y 12:* quesos tipo Camembert. Las muestras sembradas corresponden a las siguientes etapas de la elaboración: cuajada al corte (C), cuajada en el desuerado (T), lactosuero (S), quesos jóvenes (D) y quesos madurados al final de la maduración (F).

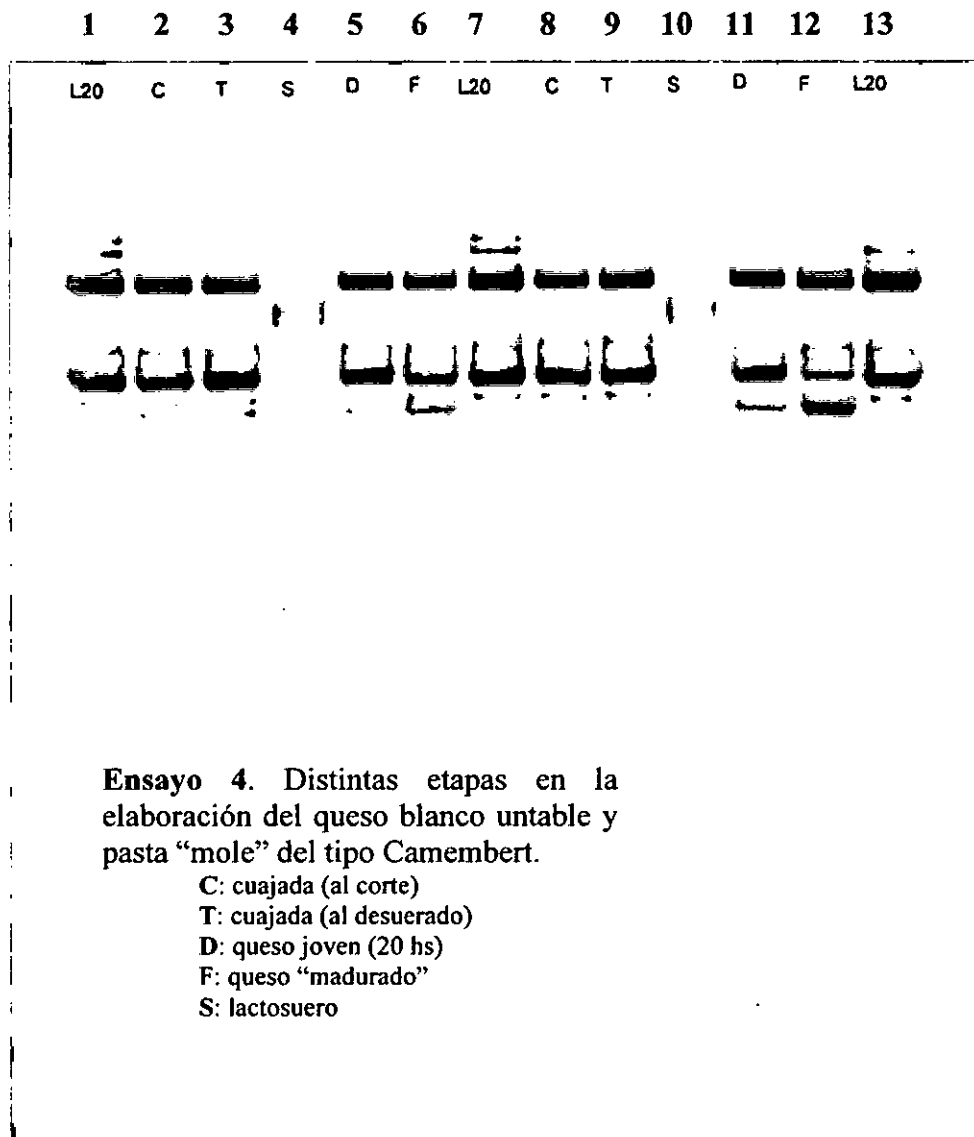
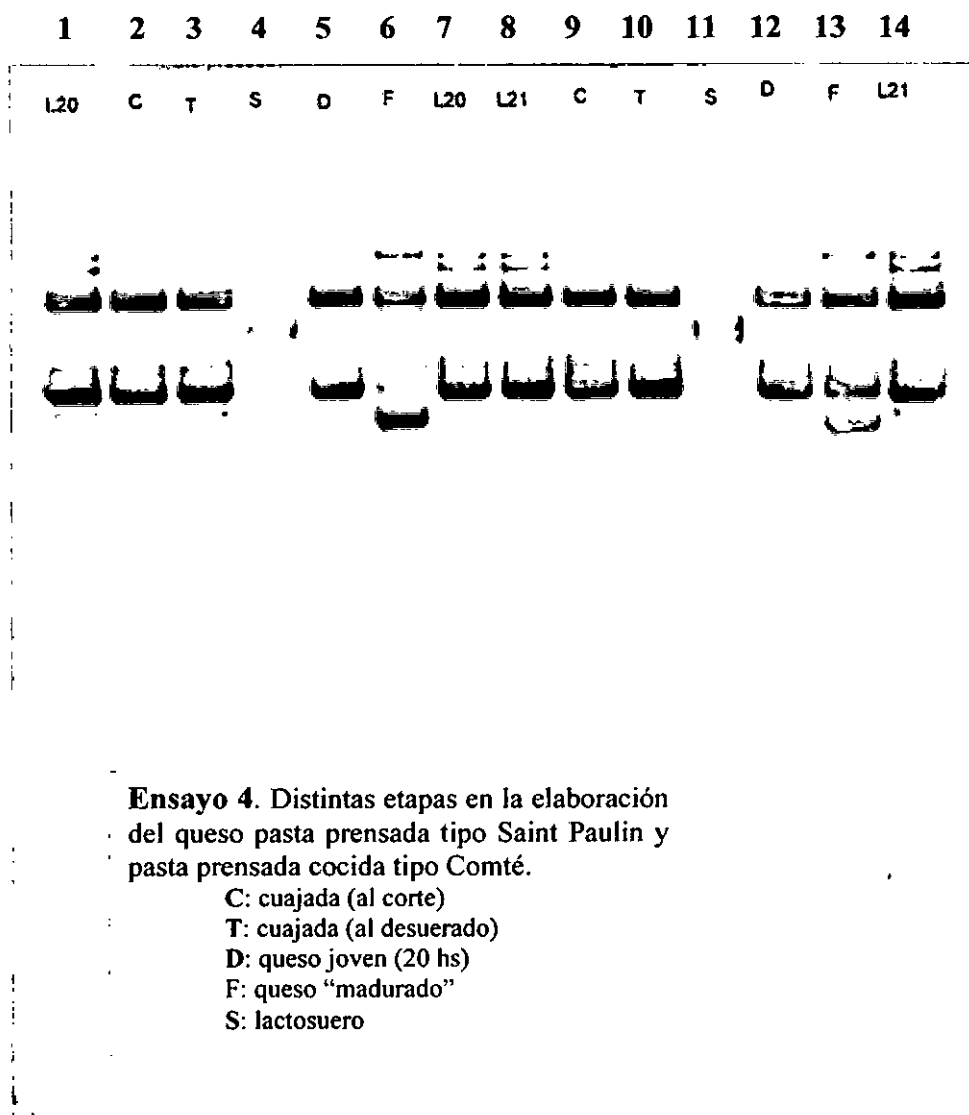


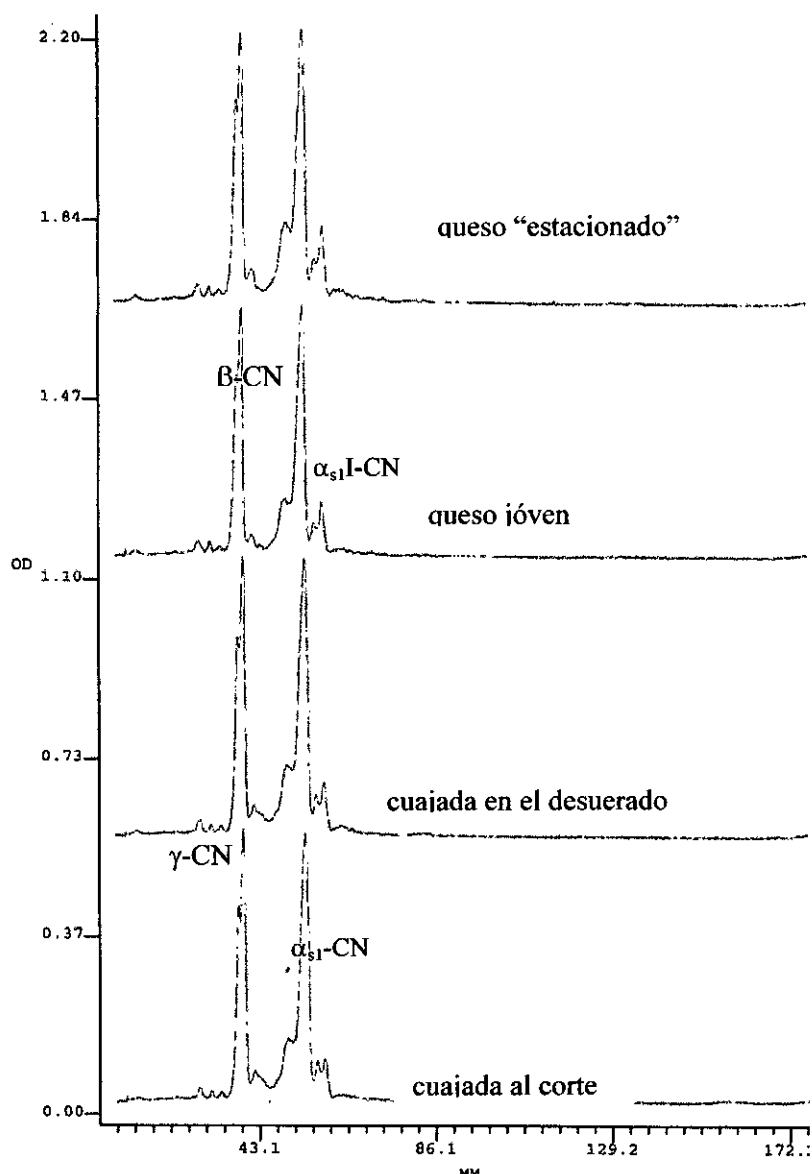
Figura 40: Urea-PAGE de los etapas de elaboración de quesos experimentales correspondiente a queso de pasta prensada tipo Saint Paulin y queso de pasta prensada cocida tipo Comté. *Calles 1, 7, 8 y 14:* leche de partida, *calles 2, 3, 4, 5 y 6:* queso pasta prensada tipo Saint Paulin, *calles 9, 10, 11, 12 y 13:* quesos pasta prensada cocida tipo Comté. Las muestras sembradas corresponden a las siguientes etapas: cuajada al corte (C), cuajada en el desuerado (T), lactosuero (S), quesos jóvenes (D) y quesos madurados al final de la maduración (F).



4.5.1.1.1. Queso blanco untable

La asignación de los picos considerados para la estimación de la proteólisis, son los mismos que para el Ensayo 1, 2 y 3. Los registros comparados de las calles correspondientes a la fracción caseínica de cada una de las etapas estudiadas para el **queso blanco untable**, pueden observarse en la **Figura 41**.

Figura 41: electroforetogramas de las etapas de elaboración y estacionamiento del queso untable.



Las áreas relativas de los picos correspondientes a las distintas fracciones caseínicas, se presentan en la **Tabla XXVI**.

Tabla XXVI: áreas relativas de los picos correspondientes a las distintas fracciones caseínicas de las distintas etapas de la elaboración del queso blanco untable, de acuerdo a la lectura densitométrica de las bandas obtenidas. Promedio (X) y desvío standard (DE) obtenido a partir de la lectura de cuatro calles, n=4.

Fracciones	Leche		Cuajada		Cuajada durante el desuerado		Queso joven		Queso estacionado	
	Área relativa		Área relativa		Área relativa		Área relativa		Área relativa	
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
1	1.257	0.278	1.177	0.197	1.157	0.145	1.230	0.082	1.257	0.300
2	0.336	0.075	0.185	0.007	0.175	0.035	0.145	0.092	0.205	0.021
3	0.638	0.123	0.265	0.007	0.255	0.035	0.245	0.106	0.335	0.035
4 γ_2 -CN	2.468	0.173	1.747 ^a	0.142	1.720 ^a	0.252	2.123 ^b	0.194	2.083 ^b	0.206
5 γ_1 -CN	2.905	0.127	0.727 ^a	0.025	0.777 ^a	0.057	1.170 ^b	0.075	1.140 ^b	0.145
6 γ_3 -CN	4.690	0.207	1.013 ^a	0.124	0.997 ^a	0.015	1.157 ^a	0.055	1.313 ^b	0.061
7 β -CN	32.898	0.685	29.830 ^b	0.350	29.977 ^b	0.732	30.400 ^b	0.704	27.857 ^a	0.465
8	0.938	0.145	2.183	0.251	2.287	0.290	2.024	0.101	3.013	0.196
9	2.768	0.217	3.140	0.114	2.593	0.227	1.047	0.225	0.815 ^b	0.049
10 (LP1)	9.953	1.269	12.857 ^a	1.084	12.573 ^a	0.689	11.960 ^a	0.440	13.330 ^b	0.964
11 α_{s1} -CN	32.467	0.997	33.387 ^b	0.165	33.257 ^b	0.172	31.880 ^b	2.321	30.397 ^a	0.496
12	2.602	0.149	3.033	0.170	2.930	0.075	2.833	0.295	2.977	0.231
13 α_{s1} I-CN	0.310	0.059	3.847 ^a	0.384	4.047 ^b	0.147	5.083 ^c	0.462	5.717 ^d	0.146
14	0.300	0.088	0.425	0.064	0.427	0.051	0.505	0.021	0.383	0.051
15	0.438	0.093	0.520	0.014	0.487	0.049	0.450	0.042	0.675	0.191
16	0.348	0.048	0.517	0.189	0.607	0.091	0.540	0.014	0.703	0.060
17	0.646	0.099	0.800	0.062	0.930	0.014	0.745	0.064	1.180	0.028
18	1.188	0.285	1.067	0.055	1.193	0.110	1.113	0.102	1.590	0.000
19	0.930	0.087	0.480	0.014	0.570	0.028	0.847	0.095	1.400	0.014
20	0.420	0.026	0.350	0.000	0.503	0.085	1.063	0.283	1.283	0.413
21	0.548	0.120	0.130	0.014	0.307	0.081	0.673	0.042	0.535	0.021
22	0.165	0.037	1.243	0.242	1.277	0.061	1.013	0.102	1.323	0.085
23 prod hid	0.282	0.092	0.130 ^a	0.014	0.290 ^b	0.026	0.255 ^b	0.049	0.695 ^c	0.092
24 prod hid	0.275	0.083	0.125 ^a	0.007	0.257 ^b	0.065	0.250 ^b	0.042	0.345 ^c	0.064

De acuerdo a los resultados obtenidos para los quesos jóvenes y estacionados (tiempo transcurrido igual a 4 días), observamos diferencias significativas entre las distintas etapas

sobre las fracciones correspondientes a la γ 2-CN, γ 1-CN, α _{s1}-CN y α _{s1}I-CN con un nivel de discriminación de $p < 0.001$, de la fracción x10 correspondiente a productos de hidrólisis de la α _{s1}-CN (LP1-f 88-199) con $p < 0.01$ y las fracciones x17, x19 y x20 correspondientes también a productos de hidrólisis no identificadas con $p < 0.05$.

Como fuera mencionado previamente, la producción de γ -CNs se considera como un indicador de la acción enzimática de la plasmina. En lo referente a la evolución de las bandas identificadas a lo largo de la elaboración, se observa que el porcentaje de γ 2-CN, γ 1-CN aumenta levemente a partir de las 20 hs y no se modifica significativamente ($p < 0.05$) durante la “maduración”. Estos resultados nos permiten inferir que la PLM actuaría en las etapas de desuerado lento (durante la noche alrededor de 16 hs) que se produce en este tipo de quesos.

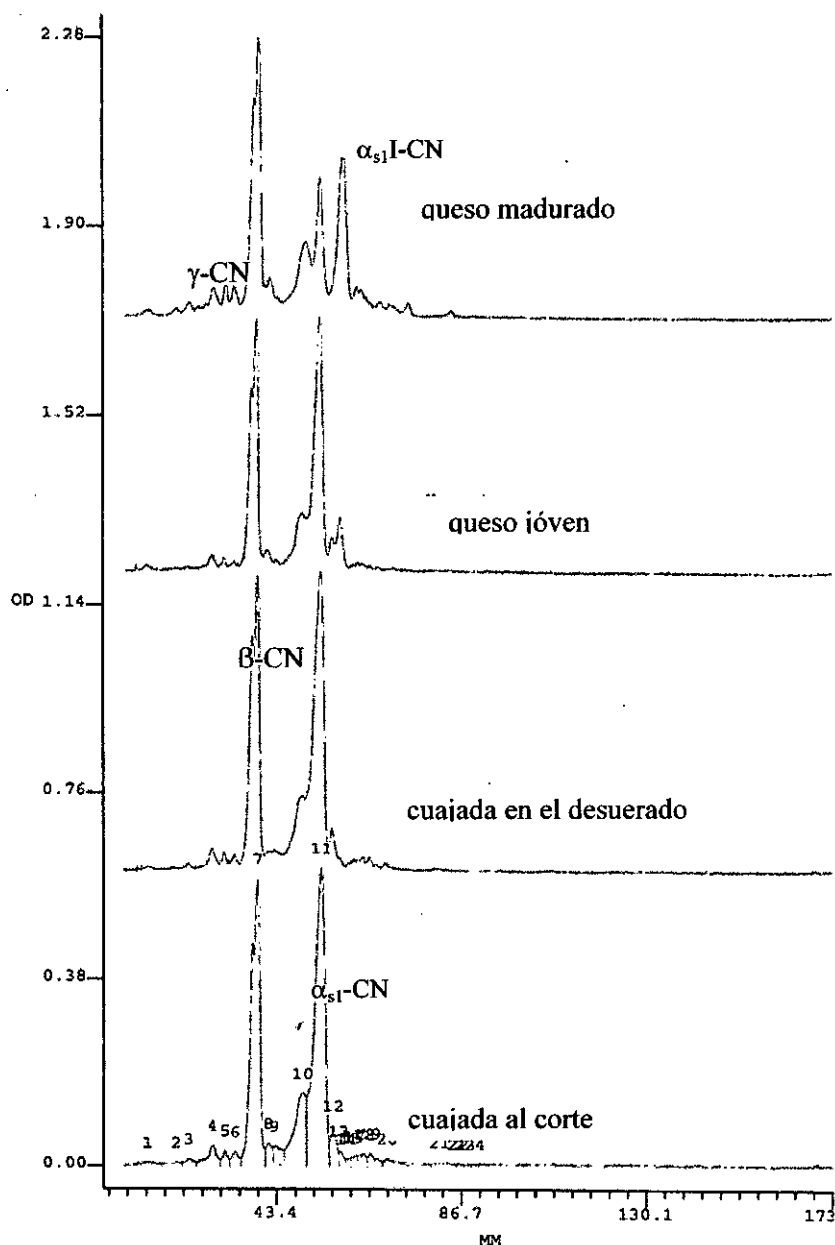
La concentración de α _{s1}I-CN, indicadora de la actividad primaria de la quimosina, si bien presenta valores bajos, aumenta durante las etapas de la elaboración. Se observó un incremento significativo a lo largo de las distintas etapas de elaboración y también durante su corto período de maduración que en este caso fue de 4 días. Podemos concluir que en la tecnología utilizada para este tipo de queso, hay una actividad significativa de la quimosina durante el trabajo en tina y a lo largo de la maduración.

Mara y Kelly (1998) observaron que el rol de la plasmina en quesos de tipo Quarg era menor, resultando en una leve producción de γ -CNs solubles, mientras el agente principal de la proteólisis es la quimosina.

4.4.1.1.2. Queso de pasta blanda "mole" tipo Camembert

La asignación de los picos considerados para la estimación de la proteólisis, son los mismos que para el Ensayo 1, 2 y 3. Pueden verse los registros representativos de las calles correspondientes a la fracción caseínica de cada una de las etapas estudiadas en la **Figura 42**.

Figura 42: electroforetogramas de las etapas de elaboración y maduración del queso tipo Camembert.



Las áreas relativas de los picos correspondientes a las distintas fracciones caseínicas, se presentan en la **Tabla XXVII**.

Tabla XXVII: áreas relativas de los picos correspondientes a las distintas fracciones caseínicas de las distintas etapas de la elaboración del queso tipo Camembert, de acuerdo a la lectura densitométrica de las bandas obtenidas. Promedio (X) y desvío standard (s) obtenido a partir de la lectura de cuatro calles, n=4.

Fracciones	Leche		Cuajada		Cuajada durante el desuerado		Queso joven		Queso madurado	
	Área relativa		Área relativa		Área relativa		Área relativa		Área relativa	
	X	s	X	s	X	s	X	s	X	s
1	1.257	0.278	1.190	0.095	0.887	0.012	0.977	0.110	1.280	0.075
2	0.336	0.075	0.156	0.052	0.130	0.028	0.270	0.099	0.325	0.021
3	0.638	0.123	0.415	0.021	0.450	0.057	0.500	0.028	0.910	0.028
4 γ_2 -CN	2.468	0.173	1.785 ^a	0.007	1.860 ^a	0.099	2.225 ^a	0.290	2.535 ^b	0.007
5 γ_1 -CN	2.905	0.127	0.990 ^a	0.147	1.090 ^a	0.111	1.355 ^b	0.021	1.900 ^c	0.118
6 γ_3 -CN	4.690	0.207	1.173 ^a	0.029	1.297 ^a	0.112	1.543 ^a	0.255	2.247 ^b	0.072
7 β -CN	32.898	0.685	29.860 ^b	0.802	30.973 ^b	0.575	30.293 ^b	1.173	28.063 ^a	0.127
8	0.938	0.145	1.077	0.165	0.800	0.071	1.550	0.464	2.553	0.125
9	2.768	0.217	2.040	0.335	1.760	0.085	0.997	0.121	1.240	0.396
10 (LP1)	9.953	1.269	11.703 ^a	0.655	11.153 ^a	0.759	11.450 ^a	1.440	12.127 ^a	0.847
11 α_{s1} -CN	32.467	0.997	36.583 ^c	0.330	36.133 ^c	0.556	29.707 ^b	0.120	15.670 ^a	0.269
12	2.602	0.149	3.023	0.215	2.947	0.311	2.498	0.163	1.573	0.373
13 α_{s1} I-CN	0.310	0.059	0.873 ^a	0.025	0.940 ^a	0.170	6.670 ^b	0.233	16.503 ^c	0.343
14	0.300	0.088	0.465	0.092	0.740	0.028	0.300	0.050	0.230	0.010
15	0.438	0.093	0.615	0.078	0.475	0.078	0.580	0.042	0.190	0.070
16	0.348	0.048	0.490	0.014	0.485	0.035	0.730	0.042	1.030	0.098
17	0.646	0.099	1.105	0.078	0.910	0.113	0.937	0.067	1.310	0.070
18	1.188	0.285	1.570	0.014	1.450	0.191	0.855	0.120	2.385	0.134
19	0.930	0.087	1.537	0.065	1.617	0.035	1.057	0.289	1.305	0.035
20	0.420	0.026	1.345	0.318	0.770	0.000	0.845	0.120	3.210	0.166
21	0.548	0.120	1.067	0.091	1.157	0.133	0.837	0.127	0.410	0.026
22	0.165	0.037	0.280	0.040	0.550	0.139	1.600	0.066	1.920	0.085
23 prod hid	0.282	0.092	0.280 ^a	0.072	0.313 ^a	0.040	0.557 ^b	0.112	1.165 ^c	0.205
24 prod hid	0.275	0.083	0.505 ^b	0.021	0.280 ^a	0.028	0.387 ^a	0.032	0.490 ^b	0.095

En los quesos de pasta blanda "mole" tipo Camembert jóvenes y madurados, observamos que el factor tiempo, tiene un efecto significativo sobre las bandas correspondientes a las fracciones γ_1 -CN, γ_3 -CN, β -CN, α_{s1} -CN, α_{s1} I-CN y los productos de hidrólisis de la α_{s1} -CN

(20, 21 y 22) con un nivel de discriminación de $p < 0.001$, de la fracción 10 correspondiente a un producto de hidrólisis de la α_{s1} -CN (LP1 f88-199) con $p < 0.01$.

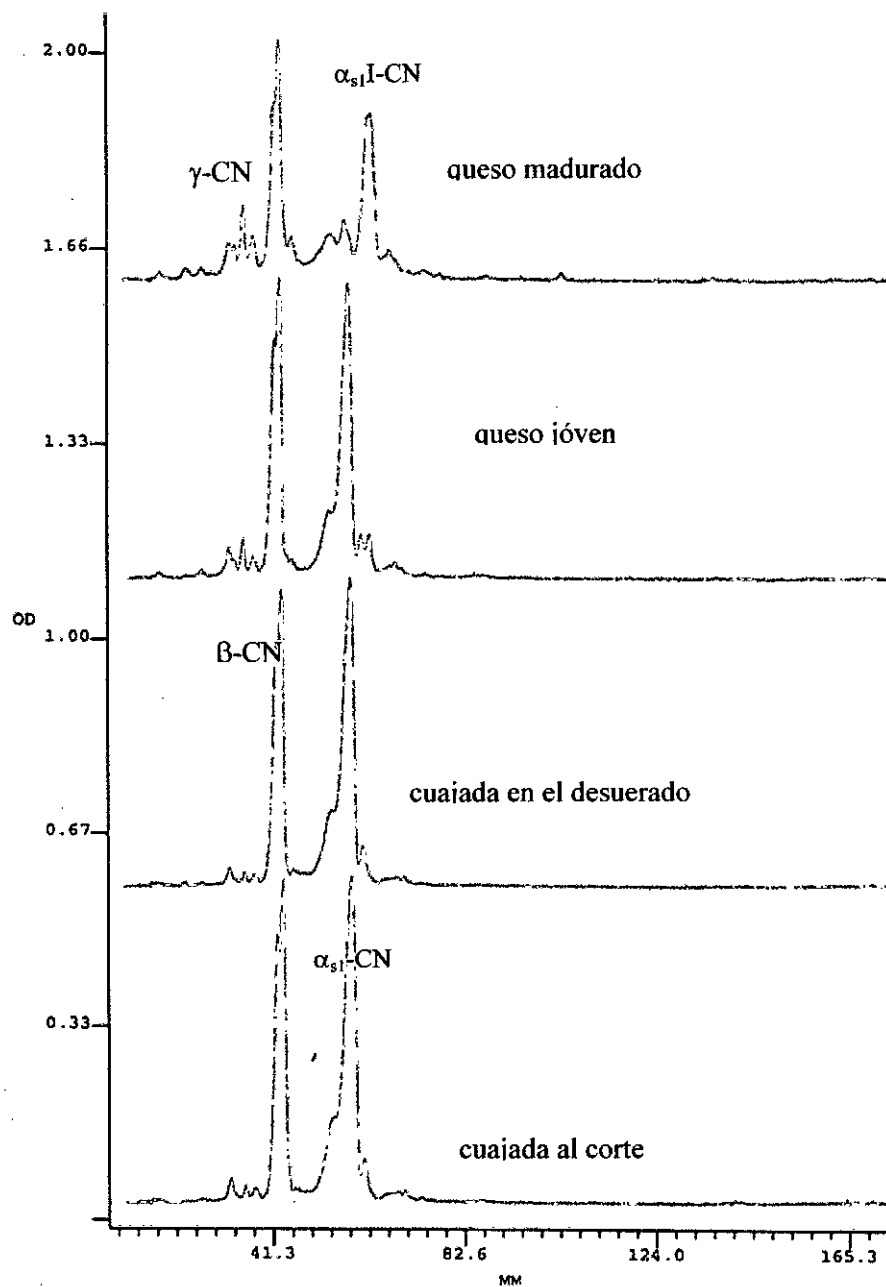
En la tecnología de los quesos madurados en superficie como los de tipo Camembert, la actividad de la plasmina aparece de manera significativa durante el proceso de moldeo, secado, posterior al trabajo en tina y desuerado. Observamos que el porcentaje de $\gamma 2$ -CN no se modifica significativamente a lo largo del tiempo, que la $\gamma 1$ -CN aumenta significativamente desde la cuajada desuerada, en los quesos jóvenes y durante la maduración, y que la fracción correspondiente a la $\gamma 3$ -CN sólo se modifica significativamente durante la maduración. Observamos una disminución regular de la β -CN a partir de la leche en tina hasta el final de la maduración.

La actividad de la quimosina se pone en evidencia durante el prensado y secado de estos quesos. Los resultados obtenidos para la α_{s1} -CN son similares a los mencionados para la β -CN. Observamos una disminución significativa entre la cuajada desuerada y las primeras 20 hs, luego una nueva disminución durante la maduración. Paralelamente, la α_{s1} I-CN aumenta entre la etapa del desuerado y el queso joven de 20 hs y luego a lo largo del período de maduración.

4.4.1.1.3. Queso de pasta prensada tipo Saint Paulin o Edam

La asignación de los picos considerados para la estimación de la proteólisis, son los mismos que para el Ensayo 1, 2 y 3. Pueden verse los registros representativos de las calles correspondientes a la fracción caseínica de cada una de las etapas estudiadas en la **Figura 43**.

Figura 43: electroforetogramas de las etapas de elaboración y maduración del queso tipo Saint Paulin.



Las áreas relativas de los picos correspondientes a las distintas fracciones caseínicas, se presentan en la **Tabla XXVIII**.

Tabla XXVIII: áreas relativas de los picos correspondientes a las distintas fracciones caseínicas de las distintas etapas de la elaboración del queso de pasta prensada tipo Saint Paulin o Edam de acuerdo a la lectura densitométrica de las bandas obtenidas. Promedio (X) y desvío standard (s) obtenido a partir de la lectura de cuatro calles, n=4.

Fracciones	Leche		Cuajada		Cuajada durante el desuerado		Queso joven		Queso madurado	
	Área relativa		Área relativa		Área relativa		Área relativa		Área relativa	
	X	s	X	s	X	s	X	s	X	s
1	1.257	0.278	0.785	0.035	0.655	0.092	1.237	0.229	1.870	0.113
2	0.336	0.075	0.460	0.028	0.485	0.078	0.647	0.095	1.403	0.040
3	0.638	0.123	1.003	0.071	0.740	0.057	1.013	0.151	1.395	0.035
4 γ_2 -CN	2.468	0.173	2.407 ^a	0.161	2.267 ^a	0.296	3.170 ^b	0.127	4.570 ^c	0.161
5 γ_1 -CN	2.905	0.127	1.097 ^a	0.117	1.190 ^a	0.197	1.645 ^b	0.132	3.910 ^c	0.085
6 γ_3 -CN	4.690	0.207	1.437 ^a	0.129	1.350 ^a	0.155	1.617 ^b	0.132	3.657 ^c	0.090
7 β -CN	32.898	0.685	30.163 ^b	1.115	27.957 ^b	2.118	29.825 ^b	1.351	24.853 ^a	0.774
8	0.938	0.145	0.845	0.007	0.670	0.057	0.910	0.184	3.435	0.516
9	2.768	0.217	2.090	0.014	1.480	0.315	0.607	0.087	1.205	0.092
10	9.953	1.269	10.987 ^a	1.072	11.170 ^a	0.057	9.643 ^a	1.249	9.025 ^a	1.351
11 α_{s1} -CN	32.467	0.997	34.893 ^c	1.167	35.375 ^c	1.874	28.760 ^b	2.841	7.570 ^a	0.392
12	2.602	0.149	3.057	0.046	2.710	0.321	2.570	0.184	1.457	0.133
13 α_{s1I} -CN	0.310	0.059	0.870 ^a	0.127	0.773 ^a	0.110	3.100 ^b	0.113	20.713 ^c	0.378
14	0.300	0.088	0.900	0.099	0.800	0.170	0.430	0.071	0.470	0.099
15	0.438	0.093	0.560	0.085	0.550	0.027	0.350	0.050	0.550	0.084
16	0.348	0.048	0.635	0.049	0.480	0.042	0.585	0.120	1.930	0.141
17	0.646	0.099	0.895	0.021	0.800	0.071	1.030	0.212	2.400	0.184
18	1.188	0.285	1.750	0.028	1.550	0.140	1.010	0.071	0.670	0.028
19	0.930	0.087	1.463	0.116	1.443	0.186	1.080	0.210	0.590	0.042
20	0.420	0.026	1.473	0.166	1.293	0.292	1.890	0.282	3.113	0.471
21	0.548	0.120	1.497	0.104	1.360	0.278	1.315	0.219	0.695	0.092
22	0.165	0.037	0.497	0.091	0.437	0.091	0.780	0.191	2.485	0.049
23 prod hid	0.282	0.092	0.505 ^a	0.007	0.620 ^a	0.085	0.583 ^a	0.076	1.727 ^b	0.236
24 prod hid	0.275	0.083	0.633 ^a	0.093	0.635 ^a	0.021	0.503 ^a	0.078	0.613a	0.068

En los quesos de pasta prensada, de acuerdo a los resultados obtenidos para los quesos jóvenes y madurados, observamos que el factor tiempo tiene un efecto significativo sobre las variables correspondientes a las fracciones γ_2 -CN γ_1 -CN, γ_3 -CN, α_{s1} -CN y α_{s1I} -CN, y

productos de hidrólisis de la α_{s1} -CN, x22 y x23 con un nivel de discriminación de $p < 0.001$, y de la variable β -CN con $p < 0.01$.

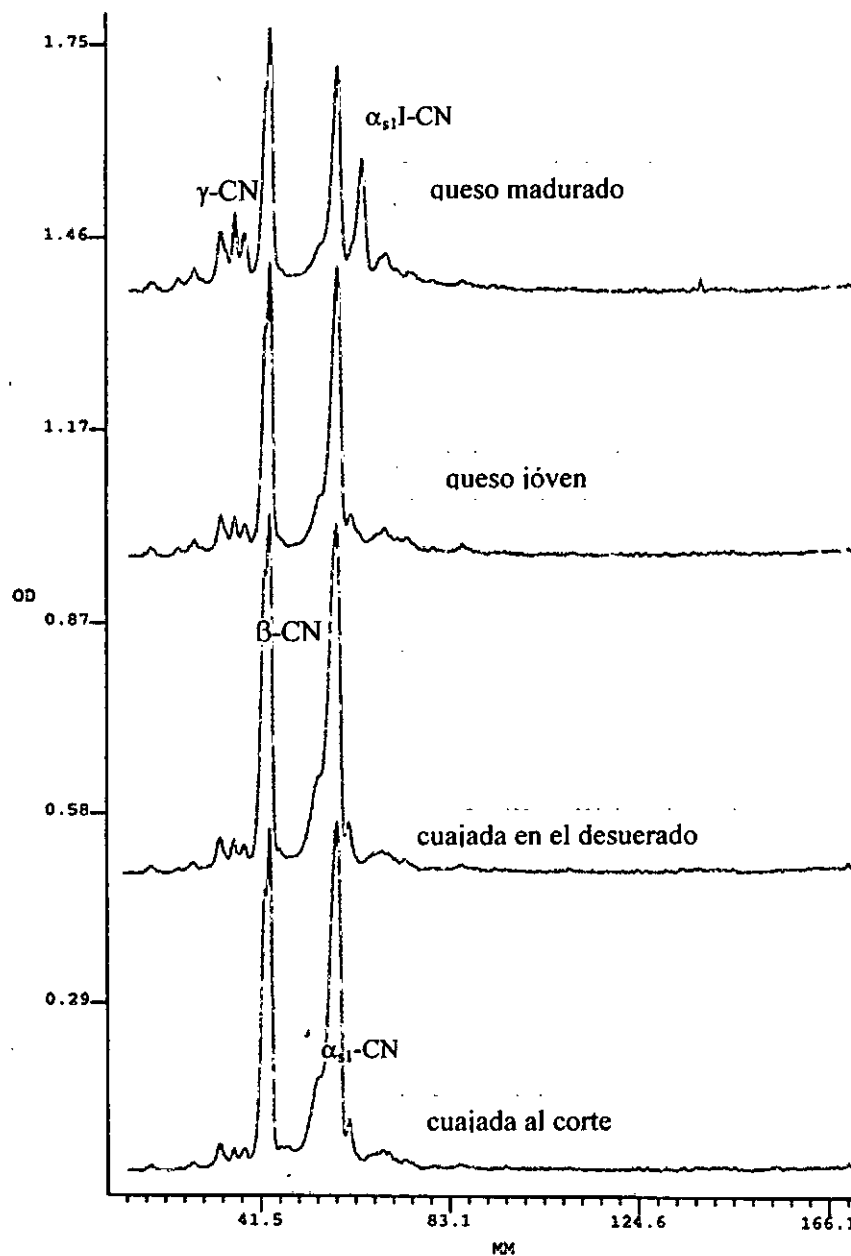
La acción de la plasmina se pone de manifiesto en las etapas posteriores al desuerado hasta la obtención del queso joven. En lo que se refiere a la evolución de las bandas identificadas durante las distintas etapas de la elaboración, observamos que los porcentajes de $\gamma 2$ -CN, $\gamma 1$ -CN y $\gamma 3$ -CN comienzan a incrementarse a partir del desuerado y se intensifica significativamente durante la maduración. El porcentaje de β -CN disminuye entre la leche y el desuerado y luego durante la maduración.

El proceso de proteólisis del cual es responsable la quimosina comienza a partir del desuerado durante el período de prensa y salado y se intensifica a lo largo de la maduración. El porcentaje de $\alpha 1$ -CN sólo disminuye durante la maduración; observándose un incremento correspondiente de la $\alpha 1I$ -CN muy notorio hacia el final de la misma.

4.4.2.1.4. Queso de pasta prensada cocida tipo Comté

La asignación de los picos considerados para la estimación de la proteólisis, son los mismos que para el Ensayo 1, 2 y 3. Pueden verse los registros representativos de las calles correspondientes a la fracción caseínica de cada una de las etapas estudiadas en la Figura 44.

Figura 44: electroforetogramas de las etapas de elaboración y maduración del queso tipo Comté.



Las áreas relativas de los picos correspondientes a las distintas fracciones caseínicas, se presentan en la **Tabla XXIX**.

Tabla XXIX: áreas relativas de los picos correspondientes a las distintas fracciones caseínicas de las distintas etapas de la elaboración del queso de pasta prensada cocida tipo Comté de acuerdo a la lectura densitométrica de las bandas obtenidas. Promedio (\bar{X}) y desvío standard (s) obtenido a partir de la lectura de cuatro calles, $n=4$.

Fracciones	Leche		Cuajada		Cuajada durante el desuerado		Queso joven		Queso madurado	
	Área relativa		Área relativa		Área relativa		Área relativa		Área relativa	
	\bar{X}	s	\bar{X}	s	\bar{X}	s	\bar{X}	s	\bar{X}	s
1	1.257	0.278	0.933	0.053	1.067	0.006	1.060	0.122	0.983	0.100
2	0.336	0.075	0.593	0.043	0.593	0.058	0.615	0.007	0.810	0.218
3	0.638	0.123	1.123	0.109	1.260	0.125	1.367	0.114	1.680	0.113
4 γ_2 -CN	2.468	0.173	2.793 ^a	0.141	3.017 ^b	0.206	3.503 ^c	0.068	4.947 ^d	0.299
5 γ_1 -CN	2.905	0.127	1.265 ^a	0.090	1.500 ^b	0.000	1.855 ^c	0.007	3.670 ^d	0.231
6 γ_3 -CN	4.690	0.207	1.643 ^a	0.104	1.727 ^a	0.081	2.173 ^b	0.174	3.673 ^c	0.316
7 β -CN	32.898	0.685	28.728 ^b	0.465	28.923 ^b	0.854	27.200 ^b	0.622	23.700 ^a	0.057
8	0.938	0.145	1.083	0.086	1.363	0.283	1.340	0.156	1.868	0.198
9	2.768	0.217	2.330	0.275	1.760	0.000	1.080	0.056	1.358	0.147
10	9.953	1.269	10.77 ^c	0.200	11.023 ^c	0.110	7.803 ^b	0.365	5.923 ^a	0.152
11 α_{s1} -CN	32.467	0.997	34.083 ^b	0.743	32.243 ^b	0.508	31.647 ^b	1.655	20.248 ^a	0.682
12	2.602	0.149	2.915	0.086	2.743	0.029	2.937	0.153	1.523	0.392
13 α_{s1} I-CN	0.310	0.059	0.837 ^a	0.093	0.697 ^a	0.012	1.807 ^b	0.068	13.467 ^c	1.309
14	0.300	0.088	0.433	0.014	0.820	0.000	0.447	0.091	0.500	0.013
15	0.438	0.093	0.670	0.026	0.910	0.000	0.540	0.080	0.565	0.078
16	0.348	0.048	1.245	0.007	0.460	0.052	0.380	0.014	1.820	0.070
17	0.646	0.099	0.570	0.083	1.210	0.000	1.355	0.007	2.757	0.203
18	1.188	0.285	1.673	0.263	1.930	0.069	4.045	0.219	0.697	0.093
19	0.930	0.087	2.263	0.210	2.627	0.006	3.295	0.120	1.143	0.212
20	0.420	0.026	1.490	0.167	1.310	0.052	1.385	0.163	4.873	0.444
21	0.548	0.120	1.840	0.085	1.913	0.064	2.460	0.240	2.553	0.240
22	0.165	0.037	0.533	0.057	0.737	0.023	0.565	0.049	0.467	0.027
23 prod hid	0.282	0.092	0.540 ^a	0.171	0.740 ^a	0.035	0.660 ^a	0.071	0.443 ^a	0.047
24 prod hid	0.275	0.083	0.793 ^a	0.099	0.853 ^a	0.075	0.815 ^a	0.117	1.143 ^a	0.138

En los quesos de pasta prensada cocida tipo Comté, de acuerdo a los resultados obtenidos, observamos que el factor tiempo tiene un efecto significativo sobre las fracciones

correspondientes a las γ 1-CN, γ 2-CN, γ 3-CN y la β -CN, α 1-CN y α 1I-CN así como las bandas relacionadas con productos de hidrólisis de la α 1-CN (LP1 f88-199), x12, x20, x21 y x24 con un nivel de discriminación de $p < 0.001$.

La acción de la plasmina, comienza durante el trabajo en tina. Observamos que los porcentajes de γ 2-CN y γ 3-CN aumentan entre la leche y la cuajada, entre el desuerado y los quesos jóvenes y durante la maduración. El porcentaje de la γ 1-CN aumenta regularmente a lo largo de todas las etapas de fabricación. Complementariamente, la β -CN disminuye a lo largo de las distintas etapas de la elaboración y la maduración.

La acción de la quimosina comienza a manifestarse después del moldeo y salado pero se intensifica a lo largo de la maduración. El porcentaje de la α 1-CN disminuye durante la maduración y de una forma similar el porcentaje de la α 1I-CN aumenta durante el mismo período.

4.4.2. CONCLUSIONES

Los resultados informados nos permiten observar que las etapas en que actúan la plasmina y quimosina son particulares para cada variedad estudiada y no se puede generalizar a partir de una única tecnología.

En las elaboraciones experimentales del presente estudio, hemos observado que el proceso de proteolisis como consecuencia de la acción de la plasmina y quimosina muestran cambios significativos en las etapas posteriores al desuerado y moldeo, y se pone de manifiesto en los quesos jóvenes incrementándose a lo largo del período de maduración.

Encontramos dos excepciones: una se refiere a la acción de la quimosina en el queso blanco untable que se pone de manifiesto en etapas de trabajo en tina y la segunda se refiere a la acción de la plasmina en los quesos de pasta prensada cocida del tipo Comté. En este caso, los indicadores de la acción enzimática se manifiestan tempranamente en la cuajada desuerada indicando una acción precoz durante el trabajo en tina.

Podríamos resumir la acción de la plasmina y quimosina en el esquema siguiente:

	<i>Actividad de plasmina</i>	<i>Actividad de quimosina</i>
Untable	post-desuerado	Trabajo en tina
Pasta blanda "mole"	post-desuerado	post-desuerado
Pasta prensada	post-desuerado	post-desuerado
Pasta prensada cocida	Trabajo en tina	post-desuerado

Barrett et al. (1999) estudiando la activación de la plasmina en quesos Cheddar, informaron que ésta ocurre principalmente durante las primeras 24 hs de elaboración, produciendo un incremento de las gamma-caseínas y del Nitrógeno soluble en agua. Adicionalmente, Lane y Fox (1997), mostraron que la enzima quimosina y la plasmina son los responsables de la degradación inicial de las caseínas mientras que los péptidos y aminoácidos libres son producidos por las enzimas pertenecientes a los fermentos.

4.5. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Con el fin de evidenciar la distribución cuantitativa de los parámetros estudiados en los distintos quesos, se llevó a cabo el Análisis de los Componentes Principales (ACP) de los quesos jóvenes (20 hs) y madurados. El ACP es el método más comúnmente utilizado para realizar el análisis multivariante.

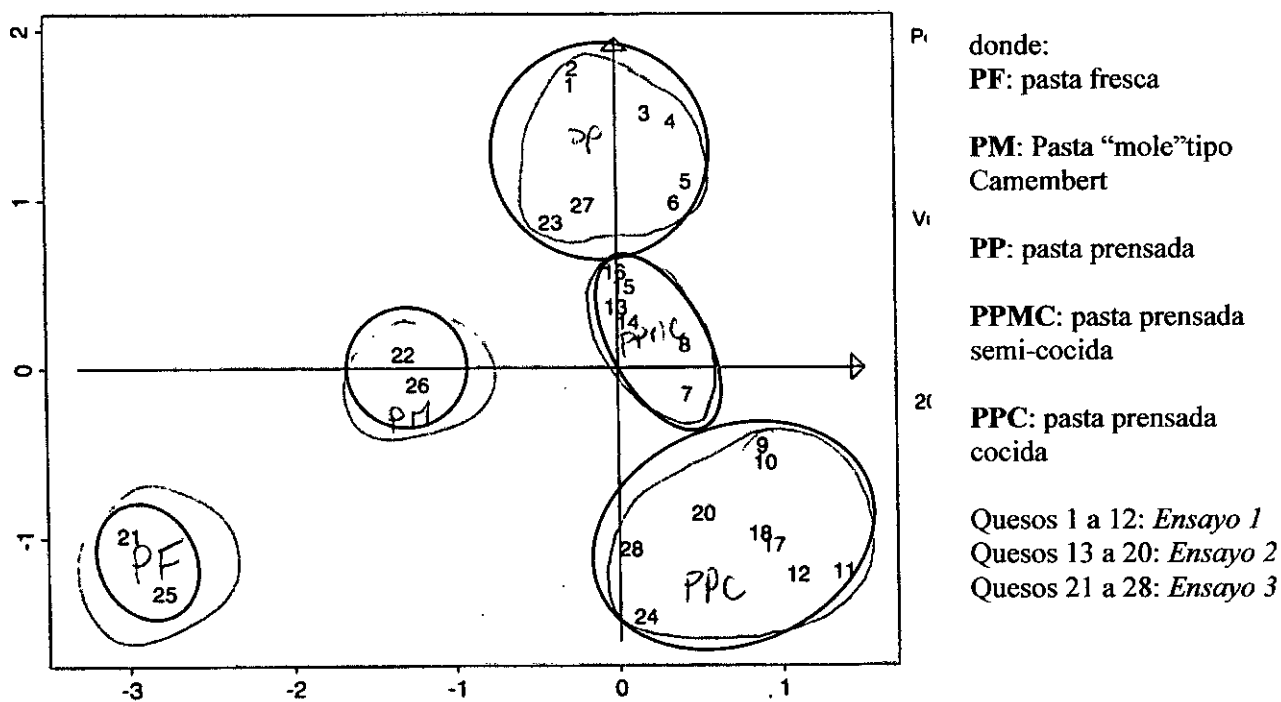
Se evaluaron los 28 quesos elaborados a lo largo de los Ensayos 1, 2 y 3. El objetivo fue observar la distribución de los distintos parámetros relacionados con la proteólisis para estudiar la posibilidad de agrupar e identificar los grupos de quesos de acuerdo al proceso de elaboración empleado.

Las variables utilizadas para el estudio de los quesos jóvenes fueron: 1) Nitrógeno Total, Extracto seco y pH, 2) las concentraciones de plasmina [PLM] de plasminógeno [PLG] y el %PLM obtenidas por el método ELISA (Tabla XX), 3) la actividad de PLM, la derivada del PLG y el %PLM (Tabla XXII), 4) los indicadores de proteólisis como Nitrógeno Soluble y la relación porcentual de Nitrógeno Soluble con respecto al Nitrógeno total y el pH (Tabla XIX), y 5) las fracciones caseínicas correspondientes a la γ 1-CN, γ 2-CN, γ 3-CN, β -CN, β I-CN, α _{s1}-CN, α _{s1}I-CN, productos de hidrólisis de la α _{s1}-CN (LP1 y la banda 20), y las relaciones $[(\alpha_{s1}I / \alpha_{s1} + \alpha_{s1}I) \times 100]$ (% α _{s1}I-CN) y $[(\sum \gamma / \beta + \sum \gamma) \times 100]$ (% γ -CN).

Las variables utilizadas para el estudio de los quesos madurados fueron los mismos que los indicados anteriormente además de materia grasa y NaCl (Tabla XIX).

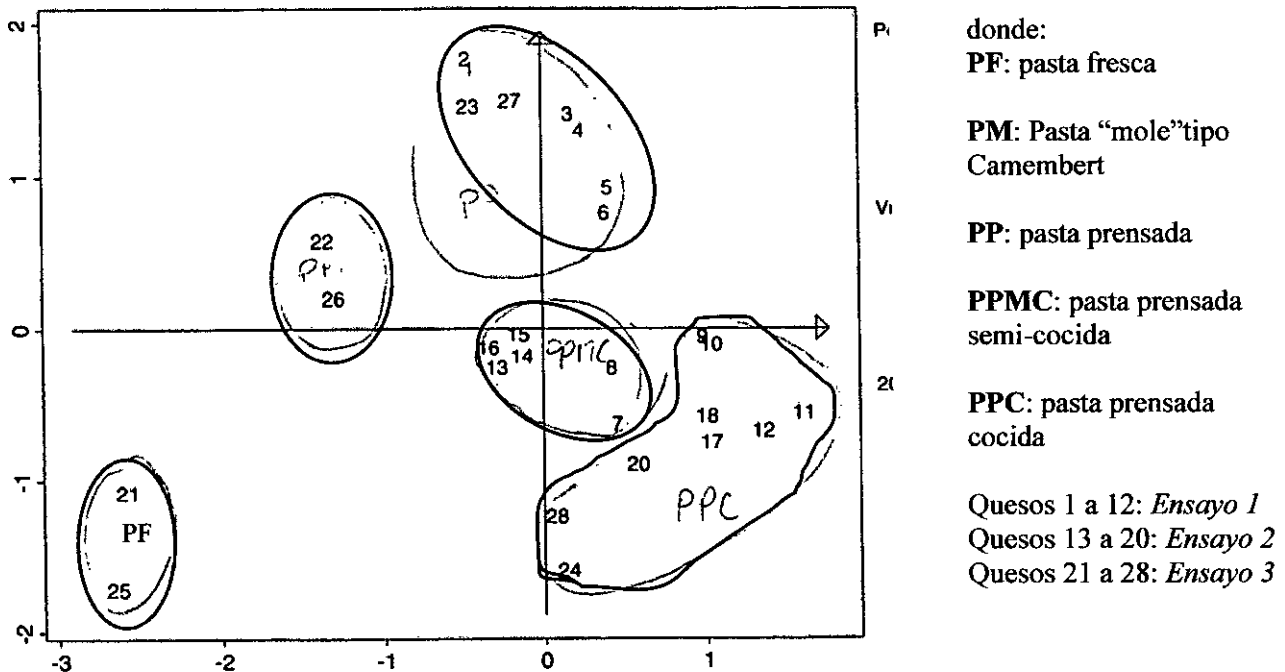
Los resultados de estos análisis pueden verse en la **Figura 45** para quesos jóvenes y la **Figura 46** para los quesos madurados.

Figura 45: Análisis de Componentes Principales (ACP) de los quesos recién elaborados (20 hs) pertenecientes a los quesos elaborados en los Ensayos 1, 2 y 3 incluyendo quesos con distinta temperatura de trabajo en tina, distinto tiempo de mantenimiento de temperaturas seleccionadas (42 y 54 °C) y las distintas variedades de queso blanco unttable, tipo Camembert, queso prensado tipo Saint Paulin, y queso prensado cocido tipo Comté.



ordenadas: componente principal 2: 5.758 (26.2%)
 abscisas: componente principal 1: 11.09 (50.4%)

Figura 46: Análisis de Componentes Principales (ACP) de los quesos madurados pertenecientes a los quesos elaborados en los Ensayos 1, 2 y 3. Idem Figura 36.



ordenadas: componente principal 2: 5.691 (27.1%)
 abscisas: componente principal 1: 9.958 (47.4%)

En las Figuras 45 y 46, se representan las muestras de quesos estudiadas. Se puede observar claramente que, a excepción de un grupo de muestras que se encuentran en la zona central de la gráfica para los quesos jóvenes y madurados, las muestras se agrupan de acuerdo a los procesos tecnológicos utilizados para su elaboración. De esta forma encontramos las distintas variedades agrupadas y distanciadas unas de otras. Aquéllas que se encuentran en la zona central son los quesos correspondientes de pasta semicocida prensada tratadas a 45 y 42 °C de los Ensayos 1 y 2 respectivamente. Estos quesos, presentaron características intermedias entre los no cocidos y los prensados cocidos. Sin embargo, si consideramos solamente aquéllas muestras del Ensayo 2, el grupo es muy consistente.

4.4.1. CONCLUSIÓN

El conjunto de los resultados obtenidos para las variables evaluadas, ha permitido individualizar los distintos tipos de quesos elaborados agrupándolos en quesos blanco untable, quesos de pasta blanda “mole” tipo Camembert, quesos de pasta prensada no cocida tipo Saint Paulin (Ensayos 1, 2, 3), quesos de pasta prensada semi-cocida tipo Edam (Ensayos 1 y 2) y quesos de pasta prensada cocida tipo Comté.

Se puede observar que los quesos que sufrieron un proceso de cocción o semi-cocción se agrupan alineados a los productos de hidrólisis de la plasmina. Aquéllos que no sufrieron cocción se agrupan alineados a un alto índice de la acción de la quimosina, determinada por los productos de hidrólisis de la α 1-CN o a proteínas intactas como en el caso del queso untable.

5. CONCLUSIONES GENERALES

El sistema enzimático compuesto por la plasmina y su precursor el plasminógeno es complejo. Los resultados presentados en este estudio, permiten aportar conocimientos y poner en evidencia la importancia de su papel en la elaboración y maduración de los quesos. La magnitud de su acción proteolítica fue cuantificada y resultó relevante en la hidrólisis de la beta-caseína y en la formación de distintos productos de hidrólisis.

Si bien varios autores estudiaron el comportamiento del sistema PLM/PLG en la elaboración de quesos, el presente es el único trabajo que ha evaluado la concentración de la Plasmina y del Plasminógeno en forma absoluta gracias a la utilización de anticuerpos monoclonales. Adicionalmente, los protocolos de elaboración de los quesos fueron similares a los empleados en la industria quesera para las distintas variedades.

En términos generales, a lo largo de los ensayos 1 y 2, los quesos fueron divididos en dos grupos de acuerdo a las características composicionales y la tecnología empleada. Los quesos pertenecientes al Grupo 1 fueron aquéllos elaborados con fermentos mesófilos y tratados a temperaturas de 32, 36, 40, 42 y 45 °C, correspondientes a quesos de pasta prensada y pasta prensada semi-cocida del tipo Saint Paulin, Edam y Pategras. Los del Grupo 2 fueron aquéllos elaborados con fermentos termófilos con una etapa de pre-maduración de la leche utilizando temperaturas de cocción de 50, 54 y 55 °C correspondientes a quesos de pasta prensada cocida del tipo Comté. En el Ensayo 3, los quesos fueron clasificados de acuerdo a las variedades estudiadas.

El par enzimático fue retenido eficazmente en la cuajada con respecto al liberado en el suero en todos los casos estudiados.

La temperatura de cocción no influyó significativamente en la retención del par PLM/PLG en los quesos del Grupo 1. Sin embargo, se produjo una reducción significativa y drástica cuando se consideraron los quesos del Grupo 2. Estos resultados se repitieron a lo largo de los tres Ensayos realizados.

La temperatura de cocción o trabajo en tina influyó significativamente en la retención de PLM, aumentando a medida que se incrementó la temperatura de 32-36 °C a 40-45 °C y utilizando fermentos mesófilos para la elaboración de quesos tipo Saint Paulin y Edam. Cuando utilizamos fermentos termófilos, la retención de la enzima sufrió una fuerte

reducción en los quesos tratados a 50 °C con un incremento significativo cuando se calentó a 55 °C para los quesos tipo Comté.

La actividad de la enzima en la masa de los quesos jóvenes, siguió la misma tendencia que la observada para la concentración. Ésta sufrió una reducción importante en los quesos del Grupo 2.

La reducción drástica de concentración y actividad retenidas observada en los quesos del Grupo 2, podría deberse a la inhibición causada por las interacciones dependientes de la temperatura de los tilo-disulfuros entre la PLM y la β -Lg. Se produciría una dificultad de acceso de la enzima debido a la unión a la superficie de las micelas de caseína de proteínas de suero modificadas, generando un impedimento estérico. Adicionalmente, a esta temperatura, los grupos sulfhidrilo de la enzima y su zimógeno no estarían accesibles dentro de la molécula plegada y por lo tanto no serían reactivos.

Independientemente de la concentración y actividad retenidas, la relación porcentual de plasmina con respecto al total (plasmina + plasminógeno) para ambos parámetros, resultó incrementarse en todos los casos a medida que aumentó la temperatura de trabajo en tina. Se observó el valor más alto para los quesos de pasta prensada cocida tipo Comté (55 °C). La magnitud de este incremento no resultó tan elevado en la actividad como lo fue para la concentración. Este hecho nos permite inferir que no toda la enzima se encuentra activa en las condiciones del trabajo, y que existe la capacidad de una activación potencial.

El tiempo de mantenimiento de la temperatura de cocción de la cuajada no afectó la retención del par enzimático. Ésto nos permitió sugerir que no es aconsejable incrementar los tiempos de trabajo en tina para lograr una mayor retención con el objetivo de lograr una maduración acelerada ya que ésto haría menos eficiente el proceso de elaboración. Si el proceso tecnológico lo permitiera, se podría reducir este tiempo a 20 minutos.

El tiempo de maduración juega un papel fundamental para la hidrólisis de las proteínas y para que el producto final adquiera las características deseadas ya que la enzima permanece activa durante este período. Esta conclusión surge ya que a pesar que la concentración y la actividad sufrieron una reducción drástica en los quesos del Grupo 2, éstos presentaron el mayor índice de proteolisis de la beta-caseína.

El estudio de los productos de hidrólisis de la β -caseína por acción de la plasmina y de las distintas etapas estudiadas en el Ensayo 4, nos permitieron conocer el momento en que se produce la activación de la enzima. Ésta es responsable de la proteólisis primaria de la β -caseína. Para los quesos de pasta prensada, prensada semi-cocida, untable y tipo Camembert, la activación de la PLM transcurrió durante el trabajo en tina observándose los productos de hidrólisis en la etapa temprana de la cuajada y continuó a lo largo de la maduración. Para los quesos de pasta prensada cocida, en cambio, la activación se produjo durante los pasos de moldeo, prensado y salado, observándose el incremento de los productos de hidrólisis en los quesos jóvenes.

Durante la maduración se observó el incremento de la actividad de la plasmina en los quesos de pasta prensada y prensada semicocida. Los quesos de pasta prensada cocida, en cambio, sufrieron una disminución de la actividad de la enzima. Este hecho refuerza la observación del tiempo de maduración como elemento fundamental para lograr la hidrólisis adecuada. Esto indica que la enzima permanece activa durante el período de maduración y puede continuar su acción sobre la β -caseína preferencialmente.

Desde el punto de vista tecnológico, la acción de la plasmina y la de la quimosina, son imprescindibles para otorgar al producto las características de flavor deseadas. Éstas contribuyen con la especificidad evidenciada en los ensayos 1, 2, 3 y 4 a la producción de péptidos de alto peso molecular, precursores de aminoácidos libres, di y tri-péptidos. Éstos son luego utilizados por las bacterias enzimáticas de las bacterias ácido lácticas y por la propia quimosina, como sustrato para las reacciones catabólicas que darán origen a los compuestos del flavor de los quesos.

La relación porcentual de Nitrógeno Soluble con respecto al Nitrógeno total, brinda un aporte parcial al conocimiento del proceso de maduración. Nuestros resultados muestran que a similitud de los índices existen modificaciones significativas de los perfiles caseínicos y peptídicos. Para conocer la matriz proteica de los quesos, por lo tanto, es necesario realizar los estudios complementarios de la fracción proteica y la fracción soluble a pH 4.4. El conjunto de estos datos, nos permite establecer el grado de proteólisis y la “huella digital” de cada tipo de queso.

El Análisis de Componentes Principales nos permitió agrupar los quesos de acuerdo a las temperaturas a los que fue sometida la cuajada en los Ensayos 1, 2 y de acuerdo a la tecnología en el Ensayo 3.



6. REFERENCIAS

- ADDEO, F.; MUCCHETTI, G.; NEVIANI, E. 1997 Biochemical aspects of cheese ripening with particular reference to hard varieties. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 48 (1) 7-20
- ALGARON, F.; MIRANDA, G.; LE BARS, D.; MONNET, V. 2004 Milk fermentation by *Lactococcus lactis* with modified proteolytic enzymes to accumulate potentially bioactive peptides. *Lait* 84: 115-123.
- ANDREWS, A. 1983 Proteins in normal bovine milk and their action on casein. *J. Dairy Res.* 50: 45-55
- ANTONSSON, M.; MOLIN, G.; ARDO, Y. 2003 Proteolysis of the semi-hard cheese Herrgard made at different dairies. Explanatory study. *Milchwissenschaft* 58: 3-4, 145-148.
- BARRETT, F. M.; KELLY, A. L.; McSWEENEY, P. 1999 Use of exogenous urokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal* 9: 421-427.
- BASTIAN, E.; HANSEN, K.; BROWN, R. 1993 Inhibition of plasmin by β -lactoglobulin using casein and a synthetic substrate. *Journal of Dairy Science* 76: 3354-3361.
- BASTIAN, E. D.; BROWN, R. J. 1996 Plasmin in milk and dairy products: an update. *International Dairy Journal* 6: 435-457.
- BASTIAN, E. D.; LO, C. G.; DAVID, K. M. M. 1997 Plasminogen activation in cheese milk: influence on swiss cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 80: 245-251.
- BAUQUIS, A. B. 2004 Metabolismo de los microorganismos de maduración: efecto en el queso. III Congreso Internacional de Marketing y Tecnología de Quesos. Organizado por Chr. Hansen y FEPALE. Punta Carrasco 20-22 de septiembre, 2004.
- BEAL, C.; DESCHAMPS, N.; JUILLARD, V.; de RISSART, H.; RICHARD, J.; SARAUX, B. 1994 Cinétiques de croissance et d'acidification des bactéries lactiques. *Bactéries Lactiques* Ed. Loriga Vol I Capítulo I-12 367-401.
- BENFELDT, C.; SORENSEN, J.; ELLEGARD, K. H.; PETERSEN, T. E. 1997 Heat treatment of cheese milk: effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* 7: 723-731
- BOUQUET, E.; DUPONT, D. 1997 Influence des facteurs technologiques sur la concentration en plasmine et plasminogène des fromages à pâte pressée cuite. Incidence sur la protéolyse et la texture des produits finaux. Rapport de stage à l'Unité de biochimie et d'immunochimie de la station de recherches en Technologie et Analyses Laitières de l'INRA, Poligny.
- BUGAUD, C.; BUCHIN, S.; COULON, J.B.; HAUWUG, A.; DUPONT, D. (2001). Influence of nature of alpine pastures on PLM activity, fatty acids and volatile compounds composition of milk. *Lait* 81: 401-404.
- BUCHIN, S.; TESSIER, L.; BERTHIER, F.; SALMON, J. C.; DUBOZ, G. 2004 How volatile compounds profiles are modified by indigenous milk microflora in hard cooked cheeses. Proceedings del IDF Symposium of Cheese. 20-25 de marzo, Praga.

- CASTAÑEDA, R.; PROSELLO, W.; MUSET, G. 1990 "Elaboración de un queso de masa blanda utilizando variantes lentas y rápidas como único starter." Libro de resúmenes del I Simposio Internacional de Industrialización de la Leche. Organizado por FIQ (UNL), INTEC (CONICET-UNL), ITA (UNL), CITIL (INTI) del 21 al 23 de agosto de 1990. Santa Fe, Argentina.
- CASTAÑEDA, R.; MUSET, G.; PROSELLO, W.; MONTERO, H.; BEZZI, W.; TRANCHIDA. 1991 "Proteólisis y desarrollo del flavour en un queso semiduro argentino elaborado con variantes rápidas y lentas de un único starter". IV Congreso Panamericano de la Leche. Guadalajara, Mexico. Libro de resúmenes.
- CASTAÑEDA, R.; OGARA, M.; STORANI, E.; FIORA, J.; ROBERTS, L.; BERMEJO, A.; GONZALEZ, M.; AGUZIN, F.; GATTI, P.; SPERANZA, J.; FEILBOGEN, E.; GLAZ, D.; AGUILAR, L. 2005 Manual para la eficiencia productiva de la PyME quesera. Capítulo 3. Editado por PIEEP Programa Incremento de la Eficiencia Energética y Productiva en la PyME quesera. Secretaría de Energía, GTZ e INTI.
- CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO, CAA. Ministerio de Salud y Ambiente. Secretaría de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias. Actualización 2005.
- COLLIN, J. C.; BERDAGUÉ, J. L.; DOGNIN-BERGERET, M.; GRAPPIN, R. 1987 Ripening and quality of Gruyere de Comté cheese. IV. Proteolysis study *Le Lait* **67**: (3) 299-318.
- COLLIN, J. C.; COMPAGNONE, P.; RYBA, I.; BAER, A. 1988 Determination of plasmin (alkaline milk proteinase) and chymosin in milk products by the ELISA assay. *Le Lait* **68**: 235-240.
- COLLOMB, M.; SPABNI, M. y STEIGER, G. 1990 Determination of the Nitrogen content according to Kjeldahl in milk products and in some of their Nitrogen containing Fractions with Automated System. *Trav. Chim. aliment. hyg.* **81**: 499-509.
- COURTIN, P.; MONNET, V.; RUL, F. 2002. Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a role in *Streptococcus thermophilus/Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology* **148**: 3413-3421.
- CRUDDEN, A.; KELLY-A.L. (2003) Studies on plasmin activity in whey. *International Dairy Journal* **13**: 12 987-993
- DAVIES, J. C. (1965) Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol.1. Basic technology. Edited by J. & A. Churchill Ltda. 104 Gloucester Place, London.
- DELACROIX-BUCHET, A.; FOURNIER, S. 1992 Proteolyse et texture des fromages a pate cuite pressée. II. Influence de la chymosine et des conditions de fabrication. *Lait* **72**: 53-72.
- DUPONT, D.; GRAPPIN, R. 1998 (a) ELISA differential quantitation of plasmin and Plasminogen in cheese. *Journal of Dairy Research* **65**: 643-651.
- DUPONT, D.; REMOND, B. COLLIN, J. C. 1998 (b) ELISA determination of plasmin and Plasminogen in milk of individual cows managed without the dry period. *Milchwissenschaft* **53** (2) 66-69.

- EKC, A. (1987) Cheesemaking. Science and Technology. Editado por Lavoisier publishing Inc.
- ENRIGHT, E. AND KELLY, A. L. 1999 The influence of heat treatment of milk on susceptibility of casein to proteolytic attack by plasmin. *Milchwissenschaft* **5** (9) 491-493.
- FAJARDO-LIRA, C.; NIELSEN, S.S. 1998 Effect of psychrotrophic microorganisms on the plasmin system in milk. *J. of Dairy Sci.* **81**: 901-908.
- FAJARDO-LIRA, C.; ORIA, M.; HAYES, K. D.; NIELSEN, S. S. 2000 Effect of psychrotrophic bacteria and of an isolated protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 on the plasmin system of fresh milk. *Journal of Dairy Science*, **83**: 2190-2199
- FANTUZ, F.; BALDI, A.; DELL'ORTO, V.; POLIDORI, F.; ROSSI, C. S.; POLITIS, J.; HEEGAARD, C. W. 1998 Distribution of Plasminogen activator forms in different fractions of buffalo milk. *Journal of Dairy Research* **65**: 521-527
- FANTUZ, F.; POLIDORI, P.; LEBBORONI, G.; POLIDORI, F.; MARIANI, P.; SUPERCHI, P.; SABBIONI, A.; SUMMER, A. 2003 Characterization of plasmin, plasminogen and plasminogen activator in gota milk. *Journal of Animal Science* **2** (Suppl. 1) 554-556.
- FARKYE, N. Y. AND FOX, P. F. 1990 Observations of plasmin activity in cheese. *Journal of Dairy Research* **57**: 413-418.
- FARKYE, N. Y. AND FOX, P. F. 1991 Preliminary study on the contribution of plasmin to proteolysis in cheddar cheese: cheese containing plasmin inhibitor, 6-aminohexanoic acid. *Journal of Food Agricultural Food Chemistry* **39**: 786-788.
- FARKYE, N. Y.; LANDKRAMMER, C. F. 1992 Milk Plasmin activity influence on cheddar cheese quality during ripening. *Journal of Food Science* **57** (3) 622-624
- FARKYE N. Y. AND FOX, P. F. 1992 Contribution of plasmin to cheddar cheese ripening: effect of added plasmin. *Journal of Dairy Research* **59**: 209-216
- FERNÁNDEZ, V.; CANDIOTTI, M.; PEROTTI, M.; BERNAL, S.; ZALAZAR, C. 2005 Estudio de los niveles de plasmina en quesos argentinos. Influencia de las variables tecnológicas sobre su actividad. Libro de resúmenes del X Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Organizado por la AATA. 18 al 20 de mayo. Mar del Plata, Argentina.
- FERNANDEZ-ESPLA, M.D.; GARAUULT, P.; MONNET, V.; RUL, F. 2000 *Streptococcus thermophilus* cell-wall anchored proteinase: release, purification and biochemical and genetic characteristics. *Appl. Environ Microb* **66** (11) 4772-4778.
- FOLKERSTMA, B., FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H. 1996 Acceleration of Cheddar cheese ripening at elevated temperatures. *Int. Dairy J.* **6**: 1117-1134.
- FOX P. F. & MC SWEENEY P. 1996 Proteolysis in cheese during ripening. *Food Rev. Int.*, **82** (4) 457-509.
- FOX P. F. 1989 Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Sci* **72** 1379-1400
- FOX P. F. & LAW, J. 1991 Enzymology of cheese ripening. *Food Biotechnol.* (5) 239-262.

- FOX, P. F. 1993. Cheese Vol I. II Ed. Elsevier Appl. Sci. Publ. London.
- FOX P. J., MC SWEENEY P., T. K. Singh. 1995 Chemistry of structure/ Function relationships in cheese. Vol 367, in: Malin E. L., Tunick, M. H. (Eds) Plenum Press, London, UK. 161-194.
- FOX P. J., MC SWEENEY P. 1996 Proteolysis in cheese during ripening. *Food-Reviews International* **12** (4) 457-509
- GAIASCHI, A.; BERETTA, B.; POIESI, C.; CONTI, A.; GIUFFRIDA, M.G.; GALLI, CL.; RESTANI, P. 2000 Proteolysis of alphas-casein as a marker of Grana Padano cheese ripening. *Journal of Dairy Science* **83**:12 2733-2739
- GAIASCHI, A.; BERETTA, B.; POIESI, C.; CONTI, A.; GIUFFRIDA, M.G.; GALLI, CL.; RESTANI, P. 2001 Proteolysis of beta-casein as a marker of Grana Padano cheese ripening. *Journal of Dairy Science* **84**:1 60-65
- GINZINGER, W.; JAROS, D.; MAYER, HK.; RIEDLER-HELLRIGL, M.; ROCKENBAUER, C.; ROHM, H.; TSCHAGER, E. 1998 Characteristics and description of Vorarlberger Bergkase. 5. Proteolysis. *Milchwissenschaft* **53** (6) 320-323.
- GINZINGER, W.; JAROS, D.; MAYER, HK.; ROHM, H.; TSCHAGER, E. 1999 Raw milk flora affects composition and quality of Bergkase. II. Chemical composition. *Lait* **79** (4) 397-410.
- GIRAUDO, M.; SÁNCHEZ, H.; MUSET, G.; PAVESI, R.; CASTAÑEDA, R.; FERNANDEZ, M.; NOSEDA, D. 2002 Determinación cuantitativa de aminoácidos libres en quesos Reggianito Argentino por derivatización con 6-AQC y RP-HPLC. *Alimentaria* **337**: 121-126
- GOMEZ M. J.; GARDE S.; GAYA P.; MEDINA M. y NÚÑEZ M. 1997 Relationship between level of hydrophobic peptides and bitterness in cheese made from pasteurized and raw milk. *Journal of Dairy Research* **64**: 289-297.
- GRAPPIN, R.; RANK, T. C.; OLSON, N. F. 1985 Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review. *J. Dairy Sci.*, **68**: 531-540.
- GRIPON, J.C.; DESMAZEAUD, M.; LE BARS, D.; BERGERE, J.L. 1975 Étude du role des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la presure commerciale. *Le Lait* **55**: 502-516.
- GUERRERO, L.; MUSET, G. 1996 Observaciones preliminares para una propuesta sobre la caracterización de fermentos según su sistema enzimático.. *REVISTA CIENTIFICA*, Venezuela, Vol VI, N°3.
- GUERRERO, L. ; MUSET, G. ; PACHECO, L. 1997 Evaluación de las actividades enzimáticas de fermentos comerciales utilizados en quesería. *REVISTA CIENTIFICA*, Venezuela, Vol VII, N°3: 209-214.
- GUERRERO, L.; MUSET, G. 1999 Study of proteolysis in argentine chesees. *Revista Argentina de Lactología*. N° **18**: 13-27.
- GUFFERTY, M. B. AND FOX, P. F. 1988 Factors affecting the release of plasmin activity from casein micelles. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **23**: 153-163.

- GUINOT-THOMAS, P.; AL-AMMOURY, M.; ROUX, Y.; LAURENT, F.; LE ROUX, Y. 1995 Study of proteolysis during storage of raw milk at 4 °C: effect of plasmin and microbial proteinases. *International Dairy Journal* 5 (7) 685-697.
- YAMAUCHI, K. 1972 Comparison of bovine milk
INNOCENTI, N.; CORRADINI, C.; BIASUTTI, M.L. 2002 "Il formaggio: tecnologia, maturazione e caratterizzazione. Consorzio Formaggio Parmigiano-Reggiano" 35-46.
- KOSIKOWSKI, F. (1970) Cheese and Fermented Milk Foods. 3^{ra} Edición. Publicado por el autor.
- HAYES, K. D.; NIELSEN, S. S. 2000. Plasmin levels in fresh milk whey and commercial whey protein products. *Journal of Dairy Science* 83: 387-394.
- HELJUCK, S.; LE BARS, D.; MOREAU, D.; YVON, M. 2004 Ability of thermophilic bacteria to produce aroma compounds from aminoacids. *Appl. Environ. Microb.* 70 (7) 3855-3861.
- HYNES, E.; DELACROIX-BUCHET, A.; SALAZAR, C. 1999 Proteolysis during ripening of soft cheeses. II. The influence of milk clotting enzyme during ripening of Cremoso Argentino cheese. *Microbiologie-Alimentation-Nutrition (MAN)* 17: 199-205.
- HYNES, E.; CANDIOTI, M.; MEINARDI, C.; SABBAG, N.; CATTANEO, T.; ZALAZAR, C. 2001 Influence of milk clotting enzyme concentration on α_{s1} casein hydrolysis during soft cheese ripening. *J. Dairy Sci.* 84: 1335-1340.
- IDF 1982 Cheese and processed cheese products. Determination of the total solids content. Standard 4A. International Dairy Federation, Brussels.
- IDF 1988 Cheese and processed cheese products. Determination of chloride content: potentiometric titration method. Standard 88A. International Dairy Federation, Brussels.
- IDF-FIL 1999 Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation. Part 2. Bulletin 337.
- M., SPINLER, H.; CORRIEU, G. 2004 Free Fatty acid evolution in ISO 1975 Butyrometric method for fat content determination in cheese according to Van Gulik. Standard 3433: 1975
- IDF-FIL 20-2: 2001 (E) Standard 8968-2.
- KELLY, A. L.; FOLEY, J. 1997 Proteolysis and storage stability of UHT milk as influenced by milk plasmin activity, plasmin/ β -lactoglobulin complexation, plasminogen activation and somatic cell count. *International Dairy Journal* 7: 411-420.
- KELLY, A. L. 1999 Effect of plasmin and somatic cell enzymes on proteolysis in aseptic and rennet free model cheeses. *Milchwissenschaft* 54 (5) 249-252.
- KERJEAN, J-R.; Thierry, A.; Romain, R. 2004 Isovaleric acid is mainly produced by *Propionibacterium freudenreichii* in Swiss cheese. Libro de proceedings del IDF Symposium of Cheese. 21-25 de marzo, Praga.
- KIERONCZYK, A., CACHON, R., FERRON, G. YVON, M. 2004 Extracellular redox potencial affects the aminoacid catabolism by *Lactococcus lactis*. Libro de proceedings del IDF Symposium of Cheese. 21-25 de marzo, Praga. *International Dairy Journal* 18: 47-56

- PRECETTI, A. S.; ORIA, M. P.; NIELSEN, S. S. 1997 Presence in bovine milk of two protease inhibitors of the plasmin system. *Journal of Dairy Science* **80**: 1490-1496.
- RAMIREZ, M. A. 2005 Manual práctico de quesería. Capítulo 1. Ediciones Ayala, S.L.
- RAMPILLI, M.; RAJA, V. 1998 Observations on residual plasmin and plasminogen activities in cheese. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* **49** (6) 341-350
- RICHARDSON, B. C.; PEARCE, K. N. 1981 The determination of plasmin in dairy products. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **16**: 209-220.
- RICHARDSON, C.; PEARCE, K. N. 1982 The determination of plasmin in dairy products. *New Zealand Journal Dairy Sci. Technol.* **16**: 209-220
- RICHARDSON, C. 1983 The proteinases of bovine milk and the effect of pasteurization on their activity. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* **18**: 233-245
- ROISSART, H. y LUQUET, F. M. (1994) Bacteries Lactiques I. Editado por Loriga. Chemin de Saint George. Francia.
- ROLLEMA, H. S.; VISSER, S.; POLL, J. K. 1983 Spectrophotometric assay of plasmin and Plasminogen in bovine milk. *Milchwissenschaft* **38**: 214-217
- RUL, F.; MONNET, V.; GRIPON, J.C. 1994. Purification and characterization of a general aminopeptidase (St-PepN) from *St. salivarius* ssp. *Thermophilus* CNRZ 302. *J. Dairy Res.* **77** (10) 2880.
- SALVADORI DEL PRATO, O. 1998 Trattato di Tecnologia casearia. Ed. Edagricole.
- SCHERZE, I.; SIENKIEWICZ, T.; KRENKEL, K. 1994 Studies on proteolytic degradation of caseins. 2. Influence of plasmin on the proteolysis in Gouda cheese. *Milchwissenschaft* **49** (10) 564-569
- SENOCCQ, D.; DUPONT, D.; ROLET-REPECAUD, O.; LEVIEUX, D. 2002 ELISA for monitoring cleavage of β -casein at site Lys28-Lys29 by PLM during Comté cheese ripening. *J. Dairy Res.* **69**: 491-500.
- SOMERS, J.; KELLY, A. 2002 Contribution of PLM to primary proteolysis during ripening of cheese: effect of milk heat treatment and cheese cooking temperature. *Lait* **82**: 181-191.
- SOMERS, J.; GUINEE, T.P.; KELLY, A. 2002 The effect of plasmin activity and cold storage of cheese milk on the composition, ripening and functionality of mozzarella-type cheese. *International Journal of Dairy Technology* **55** (1) 5-11
- SONG, X. G.; NAGAOKA, S.; KANAMARU, Y.; KUSUYA, Y. 1993 Plasmin and Plasminogen activities and casin degradation during ripening of swiss-type cheese. *Journal of the Japanese Society of Food Science and Technology* **40** (4) 287-295.
- STEELE J. L., BROADBENT J. R. 2004 Biochemistry of cheese flavor development: new insights from the genetics and physiology of lactic acid bacteria. IDF Symposium of Cheese. 20-25 de marzo, Praga.

- THIERRY, A.; MAILLARD, M.B.; YVON, M. 2002 Conversion of leucine to isovaleric acid by *Propionibacterium freudenreichii* TL34 and ITGP23. *Appl. Environ Microb* 68 (2) 608-615.
- TRUJILLO, A.J.; FELIPE, X.; GUAMIS, B.; CARRETERO, C. 1993 The effect of alkaline proteinase (plasmin) from milk on cheese ripening. Quantification methods. *Revista Española de Lechería* 44: 34-39.
- TURI, R. M.; CAUVIN, E.; SACCHI, P.; RASERO, R. 1997 Plasmin activity during ripening of a typical valle d'Aosta cheese. *Industrie-Alimentari* 36: 1341-1343
- UPADHYAY, V.K.; SOUSA, M.J.; RAVN, P.; ISRAELSEN, H.; KELLY, A.L.; McSWEENEY, P. 2004 Acceleration of proteolysis in cheese using streptokinase, a plasminogen activator. Presentación oral en el IDF International Cheese Symposium. 20-25 de marzo, Praga.
- VAN DER BERG, G. & EXTERKATE, F. A. 1993 Technological parameters involved in cheese ripening. *Int. Dairy Journal* (3) 485-507.
- VAN DER BERG, G. 1995 en Acta of the European Congress "Cheese Maturation" en Delf.
- VEISSEYRE, R. 1980 Lactología Técnica. Capítulo XIII. Editorial Acribia.
- VERDI, R.; BARBANO, D. 1991 Effect of coagulants, somatic cell enzymes, and extracellular bacterial enzymes on plasminogen activation. *Journal of Dairy Science* 74 (3) 772-782
- VISSER, S. 1993 Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavour, an overview. *J. Dairy Sci.* 76: 329-350.
- WILKINSON, M.G.; GUINEE, T.P.; O'CALLAGHAN, D.M.; FOX, P.F. 1995 Effect of cooking temperature on the lysis of starter *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* AM2, and the maturation of Cheddar cheese. *Milchwissenschaft* 30: 376-380.
- YUN, J.J.; KELLY, L.J.; BARBANO, D.M.; KINSTEDT, P.S. 1993 Mozzarella cheese: impact of cooking temperature on chemical composition, proteolysis and functional properties. *J. dairy Sci.* 76: 3664-3673.
- ZALAZAR, C. ; MEINARDI, C.; HYNES, E. 1999 Quesos típicos argentinos, producción y características. Una revisión general. Editado por el Centro de Publicaciones de la Universidad Nacional del Litoral
- ZORRILLA, S. E. Y BUBIOLO, A.C. 1995 Estimation of NaCl and KCl difusión coefficients in cheese using the difusión cell. *Latin American Applied Research* 25 (2) 111-115
- ZORRILLA, S. E. Y BUBIOLO, A.C. 1998 Modelling average concentrations of salt and salt substitutes in partial or total volumes of semihard cylindrical cheeses. *International Journal of Food Science and Technology* 33 (6) 501-508.



ANEXO 1

PROTOCOLO DE FABRICACIÓN-1a (Ensayo 1)

Quesos de pasta no cocida prensada

Preparación de la leche

Estandarización de la materia grasa: MG/PT : 1

Pasteurización a 72 °C, 15 segundos, enfriamiento y termización a 32 °C en tina, a razón de 12 kg/tina.

Siembra del cultivo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*
1 sachet de 2UI diluido en 100 ml de leche. Se adicionan a razón de 1 ml/kg de leche en tina.
Maduración: 20 minutos.

Coagulación

Coagulante: de ternero de 800 mg de quimosina/l. Dosis: 0.2 ml/kg leche

Tiempo de coagulación: 25 minutos

Tiempo de endurecimiento: 1/5 del anterior

Corte

En dos tiempos: corte lento (2 vueltas/min), reposo de 1 minuto y continuación.

Tiempo total: 3 minutos hasta lograr un tamaño de grano de 0.5 mm.

Trabajo en tina

1^{er} agitación a 32 °C

Deslactosado: retiro de 30% (3.6 kg) de suero y agregado de un 20% (2.4 kg) de agua a 32 ó 36 °C.

Agitación final durante 30 minutos a la temperatura que fija el protocolo del Ensayo 1 (32 ó 36 °C).

Moldeo

Desuerado en un recipiente receptor.

Pre-prensado: duración 20 minutos a 15 g/cm³

Cortado, moldeo e identificación del queso con números de caseína.

Prensado/ Acidificación

	Duración	T (°C)	Presión (g/cm³)	controles
Prensa + 30 min	30 min	25	50	pH
Prensa + 2 h	1 h 30 min	25	100	pH
Prensa + 4h	2 h 00 min	20	150	pH

Salado y parafinado

Temperatura: 12 °C

Duración: 2 hs para un peso de 1,4 kg.

Maduración

45 días a 12-13 °C.

REGISTRO DE DATOS DE FABRICACIÓN-1b (Ensayo 1)

PREPARACIÓN DE LA LECHE

Estandarización	MG g/l	Proteínas g/l	Relación MG/PT	
leche entera	36.3	30.5	0.99	
leche pasteurizada en tina	30.3	30.5		
	Tina 1	Tina 2	Tina 3	Tina 4
cantidad en tina (g)	12000	12000	12000	12000

TECNOLOGÍA: pasta prensada

SIEMBRA				
Fermento: 1 sachet de 2U diluido en 100 ml de leche				
Cantidad en tina (ml):	12	12	12	12

COAGULACIÓN	Coagulante de ternero 800 mg quimosina/l			
Temperatura °C	32.3	32.5	32.5	32.4
dosis (ml)	2.40	2.40	2.40	2.40
Tiempo de toma (min)	27.00	27.00	27.00	26.00
Endurecimiento (min)	5.30	5.30	5.30	5.10

COCCIÓN (20 minutos)				
Temperatura °C	32	32	36	36

EVOLUCIÓN DEL pH				
Leche de partida	6.72	6.72	6.70	6.70
pH de coagulación	6.66	6.65	6.67	6.68
pH de desuerado	6.75	6.75	6.70	6.70
pH prensa + 30 mn	6.57	6.59	6.49	6.51
pH prensa + 2 hs	6.36	6.24	6.13	6.01
pH prensa + 4 hs	5.61	5.60	5.45	5.40
pH 20 hs (salado)	5.34	5.05	5.22	5.25

N° del queso	1	2	3	4
---------------------	----------	----------	----------	----------

Peso del queso (g)				
antes del muestreo	1319.7	1339.5	1227.5	1214.8
Rendimiento/100 kg leche	11.0	11.2	10.2	10.1

pH salmuera	5.08	densidad: 1.2 g/l		
Duración salado (hs)	2	2	2	2

Programa de la célula de desuerado: 30 °C 1 hora, 25 °C 3 horas, 20 °C 20 horas
Maduración: 12 °C, 45 días

PROTOCOLO DE FABRICACIÓN-2a (Ensayo 1)

Quesos de pasta semi-cocida prensada

Preparación de la leche

Estandarización de la materia grasa: MG/PT : 1

Pasteurización a 75 °C, 15 segundos, enfriamiento y termización a 32 °C en tina, a razón de 12 kg/tina.

Siembra del cultivo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

1 sachet de 2UI diluido en 100 ml de leche. Se adicionan a razón de 2 ml/kg de leche en tina.

Maduración: 20 minutos.

Coagulación

Coagulante: de ternero de 800 mg de quimosina/l. Dosis: 0.2 ml/kg leche

Tiempo de coagulación: 25 minutos

Tiempo de endurecimiento: 1/5 del anterior

Corte

En dos tiempos: corte lento (2 vueltas/min), reposo de 1 minuto y continuación.

Tiempo total: 3 minutos hasta lograr un tamaño de grano de 0.5 mm.

Trabajo en tina

1er agitación: 10 minutos a 32 °C

Deslactosado: retiro de 30% (3.6 kg) de suero y agregado de un 20% (2.4 kg) de agua a 36 C.

Calentamiento hasta la temperatura deseada a razón de +1 °C/min.

Agitación final durante 30 minutos a la temperatura que fija el protocolo del Ensayo 1 (40 ó 45 °C).

Moldeo

Desuerado en un recipiente receptor.

Pre-prensado: duración 20 minutos a 15 g/cm³

Cortado, moldeo e identificación del queso con números de caseína.

Prensado/ Acidificación

	Duración	T (°C)	Presión (g/cm³)	controles
Prensa + 30 min	30 min	25	50	pH
Prensa + 2 h	1 h 30 min	25	100	pH
Prensa + 4h	2 h 00 min	20	150	pH

Salado y parafinado

Temperatura: 12 °C

Duración: 2 hs para un peso de 1,4 kg.

Maduración

45 días a 12-13 °C.

REGISTRO DE DATOS DE FABRICACIÓN-2b (Ensayo 1)

PREPARACIÓN DE LA LECHE

Estandarización	MG g/l	Proteínas g/l	Relación MG/PT	
leche entera	36.0	30.3	1.00	
leche pasteurizada en tina	30.3	30.5		
	Tina 1	Tina 2	Tina 3	Tina 4
cantidad en tina (g)	12000	12000	12000	12000

TECNOLOGÍA: pasta semi-cocida prensada

SIEMBRA				
Ferment: 1 sachet de 2U diluido en 100 ml de leche				
Cantidad en tina (ml):	20	20	20	20

COAGULACIÓN	Coagulante de ternero 800 mg quimosina/ml			
Temperatura °C	31.6	32.0	32.2	32.3
dosis (ml)	2.60	2.60	2.60	2.60
Tiempo de toma (min)	24.30	24.00	23.00	23.30
Endurecimiento (min)	5.00	5.00	4.30	5.00

COCCIÓN (20 minutos)				
Temperatura °C	40	40	45	45

EVOLUCIÓN DEL pH				
Leche de partida	6.76	6.76	6.75	6.75
pH de coagulación	6.71	6.67	6.67	6.68
pH de desuerado	6.64	6.63	6.58	6.60
pH prensa + 30 mn	6.28	6.26	6.10	6.12
pH prensa + 2 hs	5.67	5.60	5.58	5.60.
pH prensa + 4 hs	5.41	5.39	5.50	5.53
pH 20 hs (salado)	5.31	5.35	5.40	5.41

Nº del queso	5	6	7	8
--------------	---	---	---	---

Peso del queso (g)				
antes del muestreo	1143.9	1136.4	1071.4	1078.8
Rendimiento/100 kg leche	9.5	9.5	8.9	9.0

pH salmuera	5.11	densidad: 1.2 g/l		
Duración salado (hs)	2	2	2	2

Programa de la célula de desuerado: 30 °C 1 hora, 25 °C 3 horas, 20 °C 20 horas

Maduración: 12 °C, 45 días

PROTOCOLO DE FABRICACIÓN-3a (Ensayo 1)

Quesos de pasta cocida prensada

Preparación de la leche

Estandarización de la materia grasa: MG/PT : 1

Pasteurización a 75 °C, 15 s, enfriamiento y termización a 32.5 °C en tina, a razón de 12 kg/tina.

Siembra del cultivo

Streptococcus salivarius subsp. *Thermophilus*: envase de 2.5 UI en 100 ml de leche, se toman 5 ml/12 kg de leche en tina.

Maduración: 30 minutos.

Lactobacillus delbrueckii subsp. *Lactis* y *Lactobacillus helveticus*: envase de 2.5 UI en 100 ml de leche, se toman 2.5 ml/12 kg de leche en tina.

Maduración: 5 minutos.

Coagulación

Coagulante: de ternero de 800 mg de quimosina/l. Dosis: 0.2 ml/kg leche

Tiempo de coagulación: 30 minutos

Tiempo de endurecimiento: 1/6 del anterior

Corte

En dos tiempos: corte lento (2 vueltas/min), reposo de 1 minuto y continuación.

Tiempo total: 2.5 minutos hasta lograr un grano del tamaño del grano de maíz.

Trabajo en tina

Calentamiento hasta 50, 54 ó 55 °C en 35 minutos.

Agitación de acuerdo al protocolo de los Ensayos 1, 2 y 3.

Moldeo

Desuerado en el molde.

Prensado:

Duración: 6 hs

Presión 115 g/cm²

Giro y medición de pH a: P+ 30 min, P + 2hs, P + 4hs y P + 5.5 hs.

Acidificación

temperatura de 49 a 30 °C en 20 hs (prensado incluido).

Salado y parafinado

Temperatura: 12 °C

Duración: 3.5 hs.

Maduración

15 días a 12-13 °C, 15 días a 15-16 °C, 35 días a 21-22 °C y almacenamiento 7 días a 7 °C.

REGISTRO DE DATOS DE FABRICACIÓN-3b (Ensayo 1)

PREPARACIÓN DE LA LECHE

Estandarización	MG g/l	Proteínas g/l	Relación MG/PT	
leche entera	35.7	30.6		
leche pasteurizada en tina	30.0	30.6	0.98	
	Tina 1	Tina 2	Tina 3	Tina 4
cantidad en tina (g)	12000	12000	12000	12000

TECNOLOGÍA: pasta cocida prensada

SIEMBRA	Fermento a): 2.5U/100 ml de leche b): 2.5U/100 ml de leche:			
TA ml	5	5	5	5
LH ml	2.5	2.5	2.5	2.5

COAGULACIÓN	Coagulante de ternero 800 mg/ml			
Temperatura °C	32.5	32.4	32.5	32.4
dosis (ml)	2.10	2.10	2.10	2.10
Tiempo de toma (min)	31.30	31.00	31.00	31.00
Endurecimiento (min)	5.30	5.30	5.30	5.30

COCCIÓN (20 minutos)				
Temperatura °C	50	50	55	55

EVOLUCIÓN DEL pH				
Leche de partida	6.69	6.69	6.69	6.69
pH de coagulación	6.68	6.68	6.68	6.69
pH de desuerado	6.60	6.60	6.53	6.54
pH prensa + 1 h	6.24	6.28	6.32	6.33
pH prensa + 3 hs	5.56	5.57	6.16	6.17.
pH prensa + 4 hs	5.40	5.41	6.09	6.05
pH 20 hs (salado)	5.26	5.24	5.36	5.32

N° del queso	9	10	11	12
---------------------	---	----	----	----

Peso del queso (g)				
antes del muestreo	994.0	1004.2	980.5	997.4
Rendimiento/100 kg leche	8.3	8.4	8.2	8.3

pH salmuera	5.10	densidad: 1.2 g/l		
Duración salado (hs)	2.5	2.5	2.5	2.5

Programa de la célula de desuerado: 30 °C, 1 hora; 25 °C, 3 horas; 20 °C 20 horas.

Maduración: 12 °C, 14 días; 15 °C, 35 días; 21 °C, 4 días; 4 °C hasta los dos meses.

PROTOCOLO DE FABRICACIÓN-4a (Ensayo 2)

Quesos de pasta semi-cocida prensada

Preparación de la leche

Estandarización de la materia grasa: MG/PT : 1

Pasteurización a 75 °C, 15 s, enfriamiento y termización a 32 °C en tina, a razón de 12 kg/tina.

Siembra del cultivo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

1 sachet de 2UI diluido en 100 ml de leche. Se adicionan a razón de 2 ml/kg de leche en tina.

Maduración: 20 minutos.

Coagulación

Coagulante: de ternero de 800 mg de quimosina/l. Dosis: 0.2 ml/kg leche

Tiempo de coagulación: 25 minutos

Tiempo de endurecimiento: 1/5 del anterior

Corte

En dos tiempos: corte lento (2 vueltas/min), reposo de 1 minuto y continuación.

Tiempo total: 3 minutos hasta lograr un tamaño de grano de 0.5 mm.

Trabajo en tina

Calentamiento hasta la temperatura deseada (42 °C) a razón de +1 °C/min.

Agitación final durante 20 ó 40 minutos a la temperatura de 42 °C.

Moldeo

Desuerado en un recipiente receptor.

Pre-prensado: duración 20 minutos a 15 g/cm³

Cortado, moldeo e identificación del queso con números de caseína.

Prensado/ Acidificación

	Duración	T (°C)	Presión (g/cm³)	controles
Prensa + 30 min	30 min	25	50	pH
Prensa + 2 h	1 h 30 min	25	100	pH
Prensa + 4h	2 h 00 min	20	150	pH

Salado y parafinado

Temperatura: 12 °C

Duración: 2 hs para un peso de 1,4 kg.

Maduración

45 días a 12-13 °C.

REGISTRO DE DATOS DE FABRICACIÓN-4b (Ensayo 2)

PREPARACIÓN DE LA LECHE

Estandarización	MG g/l	Proteínas g/l	Relación MG/PT	
leche entera	37.8	31.8	1.00	
leche pasteurizada en tina	31.9	32.0		
	Tina 1	Tina 2	Tina 3	Tina 4
cantidad en tina (g)	12000	12000	12000	12000

TECNOLOGÍA: pasta semi-cocida prensada

SIEMBRA	Fermento: 1 sachet de 10U diluido en 100 ml de leche			
Cantidad en tina (ml):	3.5	3.5	3.5	3.5

COAGULACIÓN	Coagulante de ternero 800 mg quimosina/ml			
Temperatura °C	32.1	32.2	32.0	32.1
dosis (ml)	2.50	2.50	2.50	2.50
Tiempo de toma (min)	24.30	25.00	25.30	25.00
Endurecimiento (min)	5.00	5.00	5.00	5.00

COCCIÓN				
Temperatura °C	42	42	42	42
Tiempo (min)	40	40	20	20

EVOLUCIÓN DEL pH				
Leche de partida	6.68	6.69	6.69	6.69
pH de coagulación	6.67	6.68	6.68	6.69
pH de desuerado	6.56	6.60	6.53	6.54
pH prensa + 1 h	6.39	6.28	6.32	6.33
pH prensa + 3 hs	5.92	5.57	6.16	6.17.
pH prensa + 4 hs	5.56	5.41	6.09	6.05
pH prensa + 6hs	5.47	5.45	5.48	5.53
pH 20 hs (salado)	5.36	5.42	5.36	5.38

N° del queso	13	14	15	16
--------------	----	----	----	----

Peso del queso (g)				
antes del muestreo	1175.9	1148.1	1207.4	1189.7
Rendimiento/100 kg leche	9.9	9.7	10.2	10.0

pH salmuera	5.19			
Duración salado (hs)	2	2	2	2

Programa de la célula de desuerado: 30 °C, 1 hora; 25 °C, 3 horas; 20 °C 20 horas.

Maduración: 12 °C, 45 días

REGISTRO DE DATOS DE FABRICACIÓN-5 (Ensayo 2)

PREPARACIÓN DE LA LECHE

Estandarización	MG g/l	PT g/l	Relación MG/PT	
leche entera	36.0	30.3	1.00	
leche pasteurizada en tina	30.5	30.5		
	Tina 1	Tina 2	Tina 3	Tina 4
cantidad en tina (g)	12000	12000	12000	12000

TECNOLOGÍA: pasta cocida prensada

SIEMBRA	Fermento: a) 2.5U/100 ml de leche b) 2.5U/100 ml de leche			
a) ml	5	5	5	5
b) ml	2.5	2.5	2.5	2.5

COAGULACIÓN	Coagulante de ternero 800 mg quimosina/ml			
Temperatura °C	33.0	33.0	33.2	32.8
dosis (ml)	2.20	2.20	2.20	2.20
Tiempo de toma (min)	31.00	30.00	29.00	30.00
Endurecimiento (min)	5.00	5.00	5.00	5.00

COCCIÓN				
Temperatura °C	54	54	54	54
Tiempo (min)	40	40	20	20

EVOLUCIÓN DEL pH				
Leche de partida	6.73	6.72	6.70	6.71
pH de coagulación	6.73	6.69	6.70	6.70
pH de desuerado	6.52	6.53	6.53	6.53
pH prensa + 30 min	6.38	6.41	6.38	6.38
pH prensa + 2 hs	6.34	6.27	6.22	6.26
pH prensa + 4 hs	6.09	6.02	5.83	5.92
pH prensa + 6hs	5.88	5.72	5.64	5.62
pH 20 hs (salado)	5.36	5.28	5.31	5.34

N° del queso	17	18	19	20
---------------------	-----------	-----------	-----------	-----------

Peso del queso (g)				
antes del muestreo	989.2	1006.3	981.1	988.3
Retdimiento/100 kg leche	8.2	8.4	8.2	8.2

pH salmuera	5.36			
Duración salado (hs)	2.5	2.5	2.5	2.5

Programa de la célula de desuerado: 30 °C, 1 hora; 25 °C, 3 horas; 20 °C 20 horas.

Maduración: 12 °C, 14 días; 15 °C, 35 días; 21 °C, 4 días; 4 °C hasta los dos meses.

PROTOCOLO DE FABRICACIÓN-6 (Ensayo 3)

Quesos blanco untable

Preparación de la leche

Estandarización de la materia grasa: MG/PT : 1

Pasteurización a 75 °C, 15 s, enfriamiento y termización a 32 °C en tina, a razón de 12 kg/tina.

Siembra del cultivo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*
1 sachet de 2UI diluido en 100 ml de leche. Se adicionan a razón de 24 ml/ 12 kg de leche en tina.
Temperatura: 24 °C.
Maduración: 20 minutos.

Coagulación

Coagulante: de ternero de 800 mg de quimosina/l. Dosis: 1.8 ml/ 12 kg leche

Tiempo de coagulación: 25 a 30 minutos

Tiempo de endurecimiento: 18 a 20 hs

Suero en superficie: 55 °Dornic, pH 4.8.

Moldeo

Con la ayuda de un cucharón en recipientes especiales.

Temperatura: 24 °C.

Desuerado

Duración del desuerado de acuerdo a la textura deseada.

Almacenamiento

En potes a 4 °C.

PROTOCOLO DE FABRICACIÓN-7 (Ensayo 3)

Queso madurado en superficie (tipo Camembert)

Preparación de la leche

Estandarización de la materia grasa: MG/PT : 1

Pasteurización a 75 °C, 15 s, enfriamiento y termización a 32 °C en tina, a razón de 12 kg/tina.

Termización a 32.5 °C en tina, a razón de 12 kg/tina.

Siembra del cultivo .

Lactococcus lactis subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*: 2 UI/100 ml leche, se incorporan 11 ml/12 kg.

Klyveromices lactis: 2 UI/100 ml leche, se incorporan 1.5 ml/12 kg.

Penicillum camemberti: 2 UI/100 ml leche, se incorporan 3.0 ml/12 kg.

Temperatura: 35-36 °C. Maduración: 60 minutos.

Al comienzo de la etapa de maduración en tina, se ajusta el pH con glucono-delta-lactona (GDL): pH 6.45 a 6.50 (0.37g/kg/0.1 unidad de pH).

Temperatura 18 °C y acidez 18 °Dornic.

Coagulación

Coagulante: de ternero de 800 mg de quimosina/l. Dosis: 3.5 ml/13 kg leche

Tiempo de coagulación: 11-13 minutos

Tiempo de endurecimiento: 2 veces el anterior

Corte

En cubos de 2 x 2 cm.

Suero a pH 6.35.

Trabajo en tina

En tres tiempos: agitación 1 minuto, reposo de 5 minuto y continuación.

Temperatura: 33-34 °C.

Moldeo

Retiro del 30% del suero

Llenado de 5 (cinco) moldes.

Suero pH 6.20

Desuerado-acidificación

	Acidez (°D)	pH	Temperatura (°C)
Moldeo	13	6.30	33
M + 1hora	18	6.00	30
M + 3hora	40	5.70	26
M + 5hora	65	5.45	26
M + 8hora	85	5.10	24
Desmolde	115	4.90	21

Salado

Temperatura: 12 °C

Duración: 1 h.

Ressuyage

Temperatura: 14 °C, humedad relativa: 80-85%

Duración: 24 h.

Maduración

10 días a 12-13 °C, humedad relativa: 90-95%

REGISTRO DE DATOS DE FABRICACIÓN-8 (Ensayo 3)

PREPARACIÓN DE LA LECHE

Estandarización	MG g/l	Proteínas g/l	Relación MG/PT	
leche entera	36.0	30.3	1.00	
leche pasteurizada en tina	30.5	30.5		
	Tina 1	Tina 2	Tina 3	Tina 4
cantidad en tina (g)	12000	12000	12000	12000
TECNOLOGÍA (pasta)	blanco untable	pasta blanda	semi-cocida	cocida
SIEMBRA	1 sachet de 2Udiluido en 100 ml de leche			
Fermento a) (ml)	24	11	12	***
Fermento b) (ml)	***	1.5	***	***
Fermento c) (ml)	***	3	***	***
Glucono Delta Lactona (g)	***	9	***	***
Fermento d) (ml)	***	***	***	5
Fermento e) (ml)	***	***	***	2.5

COAGULACIÓN	Coagulante de ternero 800 mg quimosina/ml			
Temperatura °C	24.8	36.0	32.7	32.0
dosis (ml)	1.80	2.90	2.40	2.20
Tiempo de toma (min)	23.00	9.00	26.300	30.00
Endurecimiento (min)	19 hs	18.00	5.20	5.00

COCCIÓN				
Temperatura °C	***	***	36	54
Tiempo (min)	***	***	20	20

EVOLUCIÓN DEL pH				
Leche de partida	6.70	6.70	6.70	6.70
Leche de partida + 3 hs	6.64			
Leche de partida + 4 hs	6.57			
pH de coagulación		6.45	6.69	6.69
pH de desuerado		6.35	6.70	6.55
pH prensa + 30 min		+1 hora 6.16	6.45	6.35
pH prensa + 2 hs		+2 horas 5.87	6.18	+3 horas 6.07
pH prensa + 4 hs		+4 horas 5.42	5.64	
pH 20 hs	4.48	+9 horas 5.09		
pH 20 hs (salado)		4.85	5.04	5.29

N° del queso	21 y 25	22 y 26	23 y 27	24 y 28
Peso del queso (g)				
antes del muestreo	4280.0	(8 hormas) 1470.8	1301.9	998.2
Rendimiento/100 kg leche	35.7	13.4	10.9	8.3

pH salmuera				
Duración salado (hs)	0	1	2	2.5

Maduración 21: 4 °C , 6 días.

Maduración 22: 12 °C, 12 días.

Maduración 23: 12 °C, 45 días.

Maduración 24: 12 °C, 14 días; 15 °C, 35 días; 21 °C, 4 días; 4 °C hasta los dos meses.