

Tesis de Posgrado

Proteolisis en leche cruda y procesada

Allocati, Patricia Andrea

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Magister de la Universidad de Buenos Aires en el área de Bromatología y Tecnología de la Industrialización de Alimentos de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Allocati, Patricia Andrea. (1999). Proteolisis en leche cruda y procesada. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3241_Allocati.pdf

Cita tipo Chicago:

Allocati, Patricia Andrea. "Proteolisis en leche cruda y procesada". Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3241_Allocati.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

PROTEOLISIS EN LECHE CRUDA Y PROCESADA

Ing. Agr. PATRICIA ANDREA ALLOCATI

Director de Tesis: LIC. GRACIELA MUSET

Tesis para optar al título de :

MAGISTER DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

en el área de

BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE ALIMENTOS

- 1999 -

A mi esposo y a mis hijas

Agradecimientos

A la Lic. Graciela Muset por su valiosa dirección y constante apoyo en la ejecución de esta tesis y por haber guiado cuidadosamente mi capacitación.

A la Lic. Adela Fraschina por haber confiado en mi capacidad para llevar a cabo esta Maestría.

A todo el personal del CITIL (Centro de Investigaciones tecnológicas de la industria láctea) del INTI (Instituto Nacional de Tecnología Industrial) por su permanente y desinteresado apoyo y por su calidez.

Al CITIL por haberme permitido llevar a cabo el trabajo en sus instalaciones.

A la Lic. Mónica Haros especialmente y a aquellos Profesores de la Maestría que me brindaron su permanente aliento y desinteresado apoyo durante la realización de mis estudios.

A mis compañeros de Maestría por la hermosa amistad construida y por haberme permitido compartir momentos de alegrías y de angustias.

Al Ing. Agr. José Luis Danelón, a los integrantes de la Cátedra de Nutrición Animal y a la Ing. Agr. Dorit Fiedler por su estímulo permanente y constante colaboración.

A la Fundación Mosoteguy por haber colaborado económicamente con los gastos del trabajo de tesis.

A la Facultad de Agronomía de la UBA por haber colaborado parcialmente con el pago de la matrícula.

CONTENIDO

I. INTRODUCCION

I.1 Situación de la producción de leche en Argentina y en el mundo

I.1.1 Producción de leche en Argentina

I.1.2 Características de la industria láctea

I.1.3 Destino de la leche industrializada

I.1.4 Elaboración de productos

I.1.5 Consumo de leche y productos lácteos

I.1.6 Comercio exterior de lácteos

I.2 Composición de la leche cruda bovina

I.3 Proteínas de la leche

I.4 Enzimas proteolíticas

I.4.1 Enzimas nativas: plasmina

I.4.1.1 Efectos de la plasmina sobre las caseínas

I.4.2 Enzimas de microorganismos

I.4.2.1 Efectos de las enzimas microbianas sobre las caseínas

I.4.3 Efectos de las enzimas sobre las proteínas del suero

I.5 Metodología para determinar proteolisis

I.5.1 Electroforesis

I.5.2 TNBS

I.5.3 RP-HPLC

I.6 Consecuencias para la industria láctea de la proteolisis en leche cruda

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

III. MATERIALES Y METODOS

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

V. CONCLUSIONES

VI. BIBLIOGRAFIA

VII. ANEXO

INTRODUCCION

I.1 Situación de la producción de leche en Argentina y en el mundo

Según el último informe estadístico oficial publicado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de nuestro país (SAGyP, 1996), la producción mundial de leche alcanzó en 1996 los 532.000 millones de litros. La Argentina se ubica dentro del ranking mundial en el 15° lugar, con una producción de 8900 millones de litros en 1996, proyectándose para el año 2000 una producción estimada de 10.000 millones de litros y un consumo interno de 7.500 millones de litros (Solá F., 1997; James R, 1997). Si bien no se han publicado las estadísticas oficiales respecto a 1997 y 1998, en base a información suministrada por un núcleo de empresas que representa el 60-65% de la producción nacional esta cifra habría sido en 1998 de aproximadamente 9800 millones de litros (Infortambo, 1999). Dentro del Mercosur ocupa el 2° lugar, luego de Brasil (19.800 millones de litros), actuando principalmente como exportadora de leche y Brasil como importador. El consumo interno aparente $\{(producción+importación-exportación)/población\}$ es de 227 litros/hab/año (SAPyA, 1996), superior al consumo mínimo recomendado por la FAO de 150 lts/hab/año, y muy superior también a la media de los países en desarrollo (93 lts/hab/año) (SAPyA, 1995).

La participación de nuestro país en el mercado mundial de lácteos es un porcentaje que fluctúa entre el 1 y el 5% del total exportado de las principales commodities (SAPyA, 1996), sin embargo algunas tendencias como los compromisos de la Unión Europea y otros países desarrollados, de disminuir los subsidios agropecuarios junto con la creciente demanda de los productos lácteos de parte de los países del sudeste y este asiáticos nos colocan en buenas condiciones de competir en los mercados futuros (SAPyA, 1995; Galetto, 1996).

I.1.1 Producción de leche en Argentina

La producción de leche en nuestro país es continua a lo largo del año, con una disminución natural en invierno debido a que el sistema de producción predominante es pastoril. La industria estimula la producción en esta época mediante un mejor precio en esos meses, para satisfacer el consumo, que es más o menos constante durante el año y reducir la capacidad ociosa de las plantas procesadoras. En 1996 de los 8900 millones de litros producidos, 76% se destinó a productos como quesos, manteca, leche en polvo, yogur, dulce de leche y 24% a leches fluidas (76% a pasteurizada, 22% a esterilizada y 2% chocolatada).

Según un relevamiento del Departamento de Lechería de la Subsecretaría

de Alimentación de la Secretaría de Agricultura, Pesca y Alimentación (Buelink y col, 1996) casi la totalidad de los tambos e industrias del sector lechero se sitúan en la denominada "región pampeana" integrada por las provincias: Buenos Aires, Santa Fé, Córdoba, Entre Ríos y La Pampa con una superficie de aproximadamente 500.000 km² (Mapa N°1). Considerando como las principales productoras a las 3 mencionadas en primer término, si bien todas han mostrado crecimiento, su participación relativa en la producción nacional ha ido variando en la última década (Gráfico N°1). Buenos Aires fue perdiendo participación relativa, Santa Fé ha tenido la mayor tasa de crecimiento, mientras que las restantes han mantenido su posición. Todas las provincias muestran una importante concentración en la capacidad industrial instalada. El Gráfico N°2 muestra la importancia relativa que tienen las plantas que superan la escala de los 50.000 lts/día en cada provincia, se observa que un bajo porcentaje del total de plantas concentran gran parte de la capacidad de recibo.

La principal productora de leche del país es Santa Fé. En el año 1995 su participación en la producción nacional fue del 38%. El 90% de los tambos realiza ordeño mecánico, más del 50% realiza crianza artificial de terneros, cerca del 85% suplementan en alguna época del año y más del 60% reciben asistencia técnica, no más del 25% de los tambos realizan

inseminación artificial y sólo cerca del 20% poseen equipo de frío.

La 2º productora es la provincia de Córdoba, participando con el 34% del total nacional. El 7.4% de las plantas procesan el 58% de la producción provincial. Los productores con volúmenes de entrega superiores a los 1000 lts/día han incorporado equipos de frío en los últimos años.

La provincia de Buenos Aires participa con el 22.5% del total nacional. La provincia posee una capacidad industrial instalada superior a 7.550.000 lts/día, el 48.5% de la producción de leche es procesada por el 2% de las plantas. Las plantas del estrato 10.000- 50.000 lts/d de recibo representan el 30% y reciben el 21.5% de la leche (Gráfico N° 3). El número de tambos ha ido decreciendo, igual que en otras provincias, alcanzando un valor estimado de 6000 en 1995. La incorporación tecnológica fue inferior a la registrada por Santa Fé; una de sus ventajas comparativas es la cercanía a la Capital Federal y el Gran Buenos Aires.

I.1.2 Características de la industria láctea

Según el Censo Económico Nacional 1994 realizado por el INDEC, la Industria de Alimentos y Bebidas en la Argentina creció a una tasa anual acumulativa del 12,1% en el quinquenio 90/94, superior al del resto de la industria que fue del 8.3%. Las ramas de mayor crecimiento fueron pesca,

frutas y hortalizas, panificación y **lácteos**. Los lácteos participan con el 12% del producto bruto del sector Alimentos.

La siguiente tabla muestra datos referidos a cantidad de plantas, ubicación geográfica y capacidad instalada (CI):

PROVINCIA	C.I (lts/d)	PLANTAS*	Planta Prom.(lt/d)
CORDOBA	9.160.000	332	27.590
SANTA FE	15.882.000	162	98.037
BS AS	7.544.000	276	27.333
ENTRE RIOS	1.223.500	54	22.657
LA PAMPA	185.000	24	7.708
TOTAL	33.994.500	848	40.088

* Toda industria que recibe leche y elabora algún derivado lácteo. Una empresa puede tener varias plantas elaboradoras.

El número de empresas y plantas es un valor muy dinámico. De igual forma que ocurre en todo el mundo, hay un constante proceso de absorción de pequeñas y medianas industrias. Las principales firmas invierten fuertes sumas de dinero en la inauguración de nuevos establecimientos y en la ampliación de su capacidad de recibo (SAGyP, 1996).

La industria láctea nacional se caracteriza por la importante concentración de la recepción de la leche producida y por la diversidad de productos elaborados, dado que las principales empresas lácteas producen toda la gama de productos lácteos. Las primeras 5 empresas del ranking reúnen

el 45% del total de la leche recibida mientras que las primeras 20 absorben algo más del 60% (SAGyP, 1996).

I.1.3 Destino de la leche industrializada

Los principales destinos de la leche industrializada (excluyendo leche fluída) son quesos, leche en polvo y manteca en orden de importancia. En 1996 representaron el 93% de la leche destinada a la elaboración de productos. Si se compara el año 1996 con el promedio del quinquenio 91-95 (Gráfico N°4) se observa que la participación de los quesos se redujo un 9% y la del yogur un 3%, mientras que la de leche en polvo creció un 22% y la de manteca un 9%. Entre 1995 y 1996 se observan incrementos en la participación de las leches en polvo y los quesos y caídas en yogur, manteca y dulce de leche. Dentro de los quesos, los de pasta blanda son los más importantes, seguidos por los de pasta semidura y los de pasta dura.

Se espera que la participación de la leche fluída se mantenga en el 24% que tuvo en 1996, los quesos pueden aumentar su participación, la leche en polvo tiene pocas posibilidades de crecer en el mercado interno pero tendrá un porcentaje de participación muy alto en la leche destinada a exportación. En 1996 la leche en polvo representó el 65% del total de

productos lácteos exportados (James, R.,1997).

I.1.4 Elaboración de productos

Aquí se incluyen las toneladas o litros (para los productos de consistencia líquida) de productos obtenidos mediante algún proceso industrial. El Gráfico N°5 muestra la variación en la elaboración de los principales productos entre 1996 y 1995 y en el Gráfico N° 6 puede apreciarse la evolución desde 1989.

I.1.5 Consumo de leche y productos lácteos

En los Cuadros N° 1 y 2 se muestran la producción y el consumo aparente por habitante de leche y de algunos productos lácteos. El consumo aparente de leche en Argentina ha mostrado una interesante recuperación ubicándose un 3.2% por encima del valor de 1994 y un 7% por encima del promedio 91-95. El incremento futuro podría orientarse hacia productos con mayor valor agregado y no tanto a los tradicionales (SAGyP, 1996).

I.1.6 Comercio exterior de lácteos

El Gráfico N° 7 muestra la participación relativa de los principales productos en el total exportado con las variaciones sufridas en los últimos

años y el ranking comparativo en toneladas.

Se observa que el principal producto exportado es la leche en polvo y luego los quesos, ello se explica por el aumento de la demanda externa que ha orientado las inversiones hacia la instalación de plantas de deshidratado de leche; la leche fluída incrementó notablemente su importancia relativa en 1995 respecto al promedio del período 1991-1995, probablemente debido al desarrollo de tecnologías que permiten la destrucción de microorganismos indeseables alargando la vida útil de la leche desde días, como ocurre con la leche pasteurizada, hasta 3-4 meses, como ocurre con las leches sometidas a tratamiento UAT (ultra alta temperatura).

En el Gráfico N° 8 se puede analizar para cada producto la importancia de las exportaciones como destino de la elaboración durante 1994 y 1995, pudiéndoselos clasificar según la relación exportación/elaboración en (SAGyP, 1995):

Productos orientados a la exportación: relación mayor al 20%.

Productos de orientación mixta: relación entre 10 y 20%.

Productos orientados al mercado interno: Relación menor al 10%.

La Argentina exporta a 27 países, dentro de los cuales, los pertenecientes al Mercosur y, específicamente, Brasil son los más importantes. El Gráfico N° 9 muestra la importancia relativa de los principales bloques compradores durante 1995, 1996 y el quinquenio 91-95 (SAGyP, 1996).

En los Gráficos N° 10 y 11 puede observarse el detalle de las exportaciones lácteas por país y por producto durante 1996 en toneladas y en miles de dólares, respectivamente.

1.2 Composición de la leche cruda bovina

La leche de los mamíferos, en su estado natural, varía en su composición según las especies, sin embargo, para todas ellas y en una raza dada, los factores determinantes de la variación son la alimentación, el potencial genético y la sanidad de la ubre (Montes, A., 1966; Rearte, D, 1992). Es un alimento de alto valor nutritivo, extremadamente complejo y de su industrialización se derivan gran cantidad de productos.

En este fluido biológico coexisten sus constituyentes en varios sistemas físicos:

el sistema coloidal constituido por caseínas,

el sistema emulsión, constituido por grasa butirosa, lecitinas, colesterol, vitaminas liposolubles y carotenos y

el sistema solución formado por azúcares, sales minerales, sustancias nitrogenadas solubles (proteicas y no proteicas), vitaminas hidrosolubles, gases (Montes A., 1966).

Las fracciones químicas que componen la leche bovina son el agua en proporción de 85-90% y dentro de los sólidos totales (10-14.4%):

Lactosa (azúcar de la leche)	4.5-4.8%
Grasa butirosa (GB)	3.0-5.0%
Proteína bruta (PB)	2.6-4.0%

Minerales

0.6-0.7%

El rango implica variaciones debidas a los factores mencionados y a otros como edad de los animales, estado o momento de lactancia y estación o época del año (Gallardo y col., 1996).

Las diferencias raciales se pueden evidenciar en el siguiente cuadro (Gallardo y col.,1996):

Raza	%GB	%PB	lts/lactancia	kgGB/lact	kgPB/lact
Holstein ¹	3.60	3.25	7073	254	230
Yersey ²	5.13	3.80	4444	230	175
Pardo Suiza	4.16	3.50	5812	244	210

¹ Estados Unidos y Canadá
² Nueva Zelandia

Adaptado de Larson,B.,1985; Ensminger,M.E,1993

En él se observa que la raza Holstein presenta los porcentajes más bajos en PB (proteína bruta) y GB (grasa butirosa), pero la mayor producción por lactancia, lo cual determina sus mayores rendimientos en ambas fracciones. Los valores promedio encontrados en nuestros rodeos son un poco diferentes (3.5%GB y 3.1%PB) (Convenio INTA-Sancor,1994, citado por Gallardo, M y col.,1996), debido a que el mejoramiento durante muchos años en nuestro país, de la raza Holstein originaria de Europa con sangre Holstein de Estados Unidos y Canadá, originó la raza Holando Argentino, adaptada a nuestro sistema de manejo, principalmente pastoril

(Gallardo, M,1996).

I.3 Proteínas de la leche

La fracción nitrogenada de la leche cruda está compuesta por proteínas (94-95%, para leche bovina) y nitrógeno no proteico (5-6%, para leche bovina). Dentro de las proteínas se diferencian:

- las caseínas, sintetizadas en la glándula mamaria
- las proteínas del suero, las cuales pueden ser de síntesis en glándula mamaria (α -lactoalbumina, β -lactoglobulina) o provenir de la sangre (sero-albumina e inmunoglobulinas),
- proteínas que forman parte de la estructura de la membrana del glóbulo graso y
- enzimas

Las proteínas sintetizadas en glándula mamaria existen en distintas variantes genéticas, diferenciadas por su secuencia de aminoácidos.

Los componentes principales se encuentran en las siguientes proporciones (Creamer, L. y A. MacGibbon, 1996):

<u>COMPONENTE</u>	<u>CANTIDAD (gr/litro)</u>
CASEINAS	
α s1-caseína	9
β -caseína	9
κ -caseína	4
α s2-caseína	3
PROTEINAS SERICAS	
β -lactoglobulina	3
α -lactoalbumina	0.7
inmunoglobulinas	1
albumina	0.3

Caseínas (CN):

Las caseínas son un grupo de fosfoproteínas específicas de la leche, que para la leche bovina se definen como aquéllas que precipitan cuando se acidifica la leche descremada hasta pH 4.6 a 20 °C. La cadena polipeptídica está formada por aminoácidos, grupos fosfato unidos covalentemente como o-fosfomonoesteres a los grupos seril, y calcio unido por uniones iónicas al fosfato; tanto el calcio como el fosfato están en exceso respecto a su solubilidad pero no precipitan debido a su interacción con la caseína, 2/3 del calcio está ligado a la caseína o forma parte del fosfato de calcio coloidal, el 1/3 restante está como iones calcio libres o formando complejos con citrato o fosfato en la fase acuosa o suero.

Hay un gran número de residuos prolil distribuidos a lo largo de las

cadena produciendo una estructura terciaria abierta que facilita la digestión por enzimas proteolíticas (Mephram, T.B., 1983). Las caseínas son proteínas relativamente hidrofóbicas y en las condiciones iónicas imperantes en la leche se asocian fuertemente formando partículas esféricas de naturaleza coloidal llamadas "micelas"; su diámetro puede variar entre 20 y 600 nm, aquéllas con diámetro de 140 nm pueden estar formadas por 25.000 moléculas de caseína (Mephram, 1983; Mephram, 1987). La fosforilación de la caseína y unión del calcio al fosfato inicia la polimerización para formar las micelas, la estructura sería [caseína-PO₄ - Ca⁺⁺ - PO₄-caseína] (Hurley, W.L., 1997) (Figura N° 1). Las micelas también contienen pequeñas cantidades de citrato y magnesio.

El grupo "caseínas" (CN) está formado por una mezcla de proteínas diferentes que se clasifican en: α_S -, β -, κ - y γ -CN, siendo éstas últimas, en realidad, fragmentos C-terminal de la β - por degradación enzimática. Los tipos α_{S1} , α_{S2} y β -CN ligan el calcio y fosfato, son sensibles al calcio a la concentración normal de la leche por lo que se disponen hacia adentro en la micela, éstas tienen una capa superficial de κ -CN y entrecruzamientos disulfuro y así asociadas pueden llegar a pesos moleculares de 500.000. La relación entre los tipos de caseína mencionados es, en promedio, 3:1:3:1 variando con el tamaño de la micela, a menor tamaño mayor

proporción de κ -CN; los cambios en las proporciones de los otros tipos están menos definidos (Mephram, 1983). La relación también cambia con la temperatura ya que ésta afecta la solubilidad, como se discute posteriormente.

Dentro de cada uno de estos tipos también hay diferencias según variantes genéticas y grado de glicosilación y fosforilación.

Las α_S -CN son multifosforiladas, se pueden diferenciar, la α_{S1} y la α_{S2} y a su vez dentro de cada una se han identificado variantes genéticas.

La α_{S1} -CN está formada por una cadena polipeptídica de 199 aminoácidos. Contiene 8 átomos de fósforo por molécula y no contiene glúcidos (Figura N° 2) (Visser, 1981). Comprende el 36% de las caseínas bovinas.

La α_{S2} -CN existe como monómero o dímero: Comprende aproximadamente 12% de las caseínas bovinas. Los residuos cisteína que fueron sintetizados son oxidados en la proteína nativa y pueden ligar pequeñas moléculas (mostradas como x) o formar puentes disulfuro para dar monómeros o dímeros ((Figura N° 3) (Plard, 1990; Creamer y MacGibbon, 1996).

La β -CN en leche bovina comprende el 36% del total de caseínas. Es una cadena polipeptídica de 209 aminoácidos con 6 variantes genéticas

(Figura N° 4).

Ambas, α -CN y β -CN son insolubles a 37°C bajo las condiciones iónicas de la leche, pero si se reduce la temperatura a 5°C su solubilidad aumenta y puede disgregarse la micela.

La κ -CN está presente en la leche bovina en 16% del total de caseínas. Juega un rol esencial en la estabilización de las micelas, puesto que evita la precipitación de las otras bajo las condiciones iónicas normales de la leche. Con concentraciones diez veces superiores de calcio de las normales en leche (0.3 N) a temperatura ambiente y pH 7 la κ -CN permanece en solución mientras que las α -CN y β -CN precipitan. Es pobre en fósforo (1 a 2 átomos por molécula) pero es la única con una fracción glucídica (glicosilada). Se caracteriza además por su alto contenido en serina, treonina y cisteína. La Figura N° 5 muestra la estructura de la κ -CN (Dziuba, J y P. Minkiewicz, 1996). En su estado nativo existe como polímero entrecruzado aparentemente al azar dando un rango de tamaños. Está formada por una secuencia de 169 aminoácidos, posee una región N-terminal de 110 aminoácidos con una carga positiva neta y muy hidrofóbica (involucrada en interacciones con otras caseínas en la micela) y una región C-terminal muy abierta, hidrofílica y electronegativa, que es el componente principal de la capa externa de la micela de caseína

llamada "hairy layer", cuya función principal es ser el factor estabilizante de las micelas, y en modelos simples se ha demostrado que aumenta la capacidad de la κ -CN para estabilizar las micelas y también su resistencia a la acción de proteasas y altas temperaturas (Dziuba and Minkiewicz, 1996). Estas dos regiones están ligadas por una unión sensible a la quimosina (enzima proteolítica utilizada en la elaboración de quesos para la formación del coágulo) entre los aminoácidos 105 y 106 (que en la leche bovina, ovina y caprina es fenilalanina-metionina), recibiendo el residuo 106-169 el nombre de caseino o glico-macropéptido (CMP-GMP, respectivamente), y el residuo 1-105 denominándose para- κ -caseína. La ruptura en esta unión (proteolisis) es el primer paso en la coagulación de la leche y en la digestión de la caseína en el estómago de mamíferos, le sigue la agregación de las micelas de caseína después de la pérdida por solubilización de la superficie cargada negativamente, hidrofílica, de la micela (Dziuba and Minkiewicz, 1996). El macropéptido es uno de los principales componentes del suero dulce, subproducto de la fabricación de quesos utilizando quimosina.

Las γ -caseínas son productos de la acción de una proteinasa alcalina denominada plasmina sobre las β -CN. Se han encontrado 3 tipos γ_1 , γ_2 y γ_3 en la leche bovina que representan los residuos 29-209, 106-209 y 108-

209, respectivamente.

En la figura N° 6 (Creamer, 1996) se muestran dos modelos que intentan explicar la estructura de las micelas. El A, basado en interacciones caseína-caseína en solución, indica que hay submicelas relativamente estables cuyo tamaño se ha estimado entre 8 y 20 nm, que son agregadas por uniones via calcio o fosfato de calcio con los residuos fosfoserina sobre la superficie exterior de las submicelas para formar micelas (Creamer y MacGibbon, 1996). Este modelo no explica como la κ -CN se dispone hacia afuera.

El otro modelo (B) sugiere que las micelas se forman gradualmente a partir de la coalescencia de los componentes y la forma final tiene una distribución discontinua de proteínas y de fosfato de calcio con una tendencia de la κ -CN a disponerse hacia afuera y de los minerales a estar asociados con los residuos de fosfoserina de las caseínas y a formarse en grupos. En este caso el calcio actuaría como un neutralizador de cargas negativas más que como ligador.

Está claro que, cualquiera sea el modelo, el fosfato de calcio juega un papel muy importante en el mantenimiento de la estructura de la micela y que la estabilidad final de las mismas depende de la presencia de κ -CN intacta (Mephram, 1983). Las micelas son estabilizadas por repulsión

electrostática y estérica del "hairy layer" (Horne, 1986; citado por Dziuba and Minkiewicz, 1996).

Existen formas hidrosolubles de caseínas que ocurren en ausencia de los minerales mencionados. Tanto las formas solubles como las micelas poseen regiones hidrofóbicas, regiones con alta carga negativa, regiones de carga positiva y regiones muy susceptibles a proteinasas.

Proteínas del suero lácteo:

Las proteínas del suero lácteo son aquellas que permanecen luego de la remoción de las caseínas, es decir las que son solubles al pH de precipitación de las caseínas (Mephram, T.B., 1987; hurley, w.,1997).

β -lactoglobulina (β -LG): Es la proteína mayoritaria del suero lácteo (50%).

Actúa como transportadora de sustancias liposolubles como retinol, ácidos grasos o lípidos (Figura N° 7) (Creamer y MacGibbon, 1996).

α -lactoalbumina (α -LA): Del total de proteínas séricas ésta abarca el 25%.

Es la proteína "B" del complejo enzimático "lactosa-sintetasa", por lo cual es una proteína de sumo interés en control de la secreción láctea. Su concentración en la leche está correlacionada con la correspondiente a la lactosa. Liga Calcio y Zinc. Puede tener otros efectos no específicos sobre la integridad de las membranas de los glóbulos grasos.

Seroalbumina (SA): Proviene del suero sanguíneo y no se sintetiza en la glándula mamaria. Aparentemente entra en la leche vía filtración , aunque puede existir un mecanismo más específico de transporte. Su concentración aumenta durante procesos infecciosos/inflamatorios de la glándula mamaria como la mastitis y durante la involución uterina postparto. Su función es desconocida aunque liga ácidos grasos y otras moléculas pequeñas.

Inmunoglobulinas (Ig): En este grupo se incluyen: IgG1, IgG2, IgA, IgM. Se encuentran en muy alta concentración en el calostro y muy baja en la leche. Forman parte de la inmunidad pasiva transportada al recién nacido vía calostro y del sistema inmune mamario.

Proteosa-peptona: Son productos de hidrólisis de la β -CN por acción de la plasmina. Según su movilidad en electroforesis se designan como fracciones 3, 5 y 8. El componente 5 está formado principalmente por dos polipéptidos que son las fracciones 1-105 y 1-107 de la β -CN. Dentro del componente 8 las 2 fracciones más importantes representan los residuos 29-107 y 1-28 de la β -CN (Andrews y Alichanidis, 1983).

Otras proteínas:

Lactoferrina (LF): Es la proteína transportadora del hierro y tiene

propiedades antibacterianas. Su concentración durante la lactancia es relativamente baja pero aumenta durante la mastitis e involución uterina.

Puede actuar como inmunomodulador y es el principal factor de resistencia a las enfermedades, no específico en la glándula mamaria.

Lactoperoxidasa: Es una enzima que destruye el peróxido de hidrógeno.

Tiene también propiedades antibacterianas.

Lisozima: Es una enzima que rompe los polímeros de hidratos de carbono de la pared celular bacteriana. Tiene muy poca actividad en la leche bovina. Su actividad es importante en la leche humana y de equinos.

β 2-Microglobulina (lactolina)

Nucleasas,

Glicosidasas

Galactosiltransferasa (el componente "A" del complejo lactosa-sintetasa).

Enzima asociada a las membranas celulares en leche descremada.

La siguiente tabla muestra algunas características bioquímicas de las proteínas de la leche:

<u>Proteína</u>	<u>% aprox. en leche descr.</u>	<u>PI</u>	<u>PM</u>
α -Caseína	45-55	4.1	23,000
κ -Caseína	8-15	4.1	19,000
β -Caseína	25-35	4.5	24,000
γ -Caseína	3-7	5.8-6.0	30,650
α -Lactolbumina	2-5	5.1	14,437
β -Lactoglobulina	7-12	5.3	18,000
Suero albumina de sangre	0.7-1.3	4.7	68,000
Lactoferrina	0.2-0.8		87,000
Inmunoglobulinas:			
IgG1	1-2		160,000
IgG2	0.2-0.5		160,000
IgM	0.1-0.2		~1,000,000
IgA	0.05-0.10		~400,000
Proteosa peptona	2-6	3.3-3.7	4,100 a 200,000

Adaptado de RD Bremel, University of Wisconsin (citado por Hurley, 1997).

I. 4 Enzimas proteolíticas

Las enzimas proteolíticas están involucradas en procesos cruciales para la industria láctea como producción y maduración de quesos y manufactura de productos inoculados como yogur, etc. También pueden ser responsables de la aparición de defectos indeseables como off-flavours y/o deterioro físico-químico como sedimentación o procesos de gelificación durante el almacenamiento o vida útil en estantería (Collins, S. y col, 1993). Estas enzimas que existen en la leche tienen dos orígenes: sangre (enzimas nativas) y microorganismos presentes desarrollados

durante el tiempo de refrigeración. Se ha demostrado que el tratamiento ultra alta temperatura (UAT) directo a 142°C durante 4 segundos es insuficiente para inactivar una serie de proteasas, es decir son termorresistentes (Snoeren, T., 1979).

Frecuentemente se utiliza el tratamiento con calor para eliminar la actividad enzimática por desnaturalización irreversible de las moléculas de enzimas, sin embargo si ésta es termorresistente y convive con su inhibidor termolábil, el tratamiento con calor en realidad aumenta la susceptibilidad del sustrato, obteniéndose el efecto opuesto al buscado. Se ha demostrado en leche la presencia de estos sistemas enzima-inhibidor. Klostermeyer y col (1975) (citado por Visser S., 1981) agregó varios tipos de enzimas proteolíticas a leche descremada cruda y calentada (90°C, 10 min) y encontró siempre mayor grado de proteolisis en las leches tratadas con calor. Snoeren y col (1979) reportaron menores niveles de proteína soluble y mayores de caseína cuando se aplicó el tratamiento UAT directo respecto al control sin tratamiento, debido a que las proteínas séricas parcialmente desnaturalizadas pueden precipitar a pH 4.6 junto con las caseínas.

I.4.1 Enzimas nativas

Trabajos que datan de la década del 60 confirman la presencia de proteinasas no bacterianas, nativas en la leche. La más importante es una enzima alcalina análoga a la plasmina del suero sanguíneo. Se secreta en leche como su precursor inactivo plasminógeno, el cual se ha detectado en el lumen de la célula alveolar mamaria, aunque no es su lugar de síntesis.

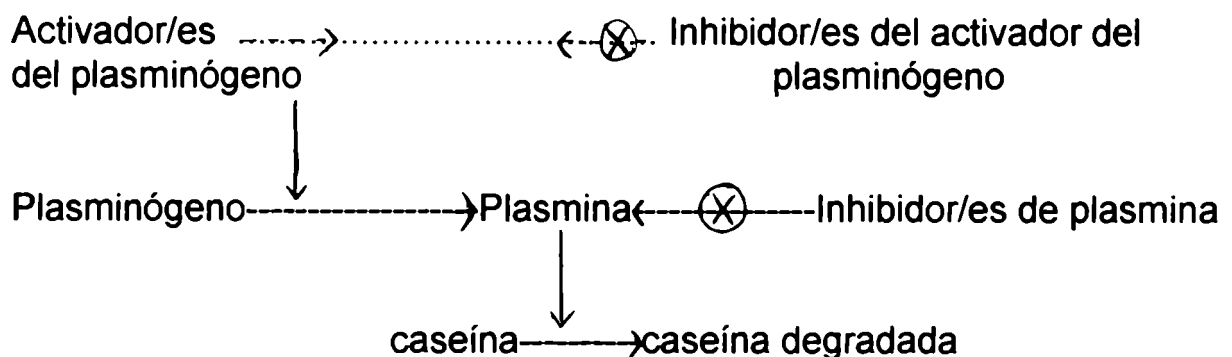
Las concentraciones de plasmina en sangre y leche son 200 y 0.3 mg/litro, respectivamente (Halpaap y col., 1977, citado por Bastian, E. Y R. Brown, 1996). Su actividad óptima es a pH 7.4-7.5 y 37°C aunque se demostró en quesos que tiene actividad en un amplio rango de pH (Bastian y Brown, 1996) y aún en almacenamiento en frío. Hidroliza preferencialmente uniones Lis-X.

El plasminógeno contiene 786 aminoácidos y posee un PM de 88092. Es activado por hidrólisis de la unión peptídica Arg⁵⁵⁷ -Ile⁵⁵⁸ (arginina-isoleucina). Según Lu y Nielsen (1993), existen 5 proteínas en la leche bovina capaces de activar el plasminógeno, presumiblemente del tipo uroquinasa; mientras que Heegard y col. (1994) y White y col. (1995) citan como principales, dos tipos de uroquinasa de masas moleculares de 30 y 50 kDa, asociadas con las células somáticas, ya que son producidas

por los macrófagos (células que predominan en la glándula mamaria sana) y un activador del plasminógeno (denominado activador-t), asociado con las micelas de caseína y de masa molecular de 75 kDa (White y col, 1995).

La plasmina está asociada a las micelas de caseína y a la membrana del glóbulo graso y está presente de esta forma en leche de vaca, búfala, cabra y yegua. Los inhibidores de la plasmina y los inhibidores del activador del plasminógeno solo se encuentran en el suero de la leche; de este último se han detectado dos tipos específicos, PAI-1 y PAI-2 (inhibidores del activador del plasminógeno, 1 y 2, respectivamente) (White y col, 1995).

En ausencia de inhibidores, el activador del plasminógeno produce plasmina activa según el siguiente esquema:



La plasmina se ha podido aislar de leche cruda y de leche con tratamiento UAT (ultra alta temperatura-140°C 4s), es decir que se considera termorresistente. Actúa fundamentalmente sobre β -, α s2- y α s1-CN, siendo éste el orden decreciente de susceptibilidad. La κ -CN es resistente a su acción.

En razón de provenir de sangre se espera un aumento de la misma en leche cuando se altera la permeabilidad de las membranas de las células alveolares del tejido mamario, durante procesos inflamatorios/infecciosos como la mastitis. Cabe aclarar que el recuento de células somáticas, superado determinado umbral, es indicador de presencia de mastitis subclínica, y por ser determinante de la calidad sanitaria de la leche (junto con la brucelosis y tuberculosis), existen límites fijados por las industrias a nivel nacional para la bonificación en el precio, y a nivel internacional para poder ser tratada térmicamente y poder ser destinada a intercambios comunitarios, por las directivas de la UE (Unión Europea) (CEE, 1992), aunque en nuestro país no existe legislación al respecto.

Politis y col. (1989) (citados por Bastian, E. y R. Brown, 1996) reportaron que a medida que el recuento de células somáticas/ml (RCS/ml) aumentó desde menos de 250.000 hasta más de 1 millón las concentraciones de plasmina y plasminógeno aumentaron desde 0.18 a 0.37 mg/litro y desde

0.85 a 1.48 mg/litro, respectivamente. Su actividad también es mayor en células somáticas de leche de vacas mastítica que en leche de vacas sanas (Zachos y col, 1992; Bastian, E. y R. Brown, 1996), lo cual algunos autores (Barry y Donnelly, 1981; Grufferty y Fox, 1988, citados por Bastian, E. y R. Brown, 1996) han atribuido a la presencia de activadores del plasminógeno (uroquinasa) o enzimas proteolíticas en las células somáticas, como se dijo anteriormente.

La actividad de la plasmina también aumenta hacia el final de la lactancia, hallándose mayor cantidad de γ -CN y menos β -CN y α S1-CN al final de la lactancia que en la lactancia media (Barry y Donnelly, 1980, 1981; citados por Bastian, E. y R. Brown, 1996; Korycka-Dahl M., 1983).

Al parecer, el flujo de enzima hacia la leche aumenta al principio de la lactancia y permanece luego constante, aumentando hacia el final de la misma, la activación del plasminógeno por mayor actividad del activador (Gilmore, J., 1995; Baldi y col., 1996; Bastian, E. y R. Brown, 1996). Politis y col. (1989) (citados por Bastian, E. y R. Brown, 1996) encontraron disminución de la relación plasminógeno/plasmina desde 7 al principio de la lactancia, hasta 3 al final de la misma. El efecto de "momento de lactancia" también se asoció a que el aumento de la actividad de la plasmina podría deberse a la restricción alimenticia utilizada como práctica

de secado de vacas (Prosser y col, 1995).

Analizando actividad de plasmina segun el número de lactancia se observa una interacción con el estado de lactancia. En vacas de 1º lactancia la actividad de la plasmina permanece constante a lo largo de toda ella mientras que en leche de vacas de mayor edad o número de lactancia la actividad aumenta dramáticamente durante el transcurso de la lactancia (Politis y col, 1989; Bastian y col, 1991; citados por Bastian, E. y R. Brown, 1996). Un estudio realizado por Saeman y col. (1988) (citados por Bastian, E. y R. Brown, 1996) en el cual se indujo mastitis en vacas Holstein y se midió CS (células somáticas) y actividad proteolítica total (plasmina y otras proteasas asociadas a las CS) muestra que estos parámetros aumentaron durante la infección y aunque luego de la curación los niveles de CS bajaron a los valores de preinfección, la actividad proteolítica fue significativamente mayor que en la preinfección principalmente debido a la plasmina. Según Bastian y Brown (1996) ésta podría ser la razón por la cual la leche de vacas más viejas tiene mayor actividad de plasmina que la de vacas más jóvenes.

I.4.1.1 Efectos de la plasmina sobre las caseínas

La acción de la plasmina sobre la β -CN ocurre en tres puntos

sensibles de la molécula: Lys²⁸-Lys²⁹, Lys¹⁰⁵-His¹⁰⁶ y Lys¹⁰⁷-Glu¹⁰⁸ liberando los siguientes péptidos: γ 1-CN (29-209), γ 2-CN (106-209), γ 3-CN (108-209), componente 8-rápido de proteosa peptona (1-28), β -CN-1P (29-105 y 29-107) (Andrews y Alichanidis, 1983) siendo este último propuesto como indicador de proteólisis dada su alta correlación con la actividad de plasmina y por ser un producto final de degradación (Andrews, A., 1983; Le Roux y col., 1995b), componente 5 de proteosa peptona (1-105 y 1-107). A las γ -CN se le atribuye ser responsables del sabor astringente desarrollado en muestras de leche cruda, y en pasteurizadas o UAT durante el almacenamiento (Harwalkar y col, 1993).

Snoeren y van Riel (1979) (citado por Bastian, E. Y R. Brown, 1996) reportaron una rápida proteólisis de la α S₁-CN por plasmina sanguínea y de la leche. Según trabajos de Le Bars y Gripon (1989) y Visser y col (1989) en sistemas tamponados (in vitro), existen en la molécula 8 sitios sensibles a la enzima, siete de ellos son Lys-X y uno es Arg-X, la mayoría de los péptidos liberados son solubles a pH 4.6, pero no se ha comprobado su presencia en leche, sin embargo sí lo ha sido en quesos donde los productos de proteólisis son péptidos hidrofóbicos responsables del sabor amargo (Farkye, N., 1995).

Respecto a la α S₁-CN, su susceptibilidad a la plasmina es menor que la

de β -CN (Andrews y Alichanidis, 1983; Le Bars y Gripon, 1993). Según Aimutis y Eigel (1982) (citado por Bastian, E. y R. Brown, 1996) los patrones electroforéticos de λ -CN fueron idénticos a los patrones de péptidos derivados de la incubación de α_{s1} -CN con plasmina. Los sitios sensibles fueron identificados por dos grupos de investigación (Le Bars y Gripon, 1993; McSweeney y col., 1993, citado por Farkye N., 1995). El primer grupo reporta que siete uniones Lys-X y cuatro Arg-X fueron hidrolizadas por plasmina resultando en 15 péptidos, siendo los más hidrofóbicos, insolubles a pH 4.6 y presentando movilidad electroforética mayor a la α_{s1} -CN; mientras que según el grupo de McSweeney existen doce uniones Lys-X sensibles a la plasmina y cinco Arg-X; este último grupo también identificó 26 péptidos liberados. Collin y col. (1987) denomina α_{s1} I -CN al fragmento C-terminal 24-199 de la α_{s1} -CN liberado durante la maduración del queso Gruyère de Comté. De igual forma, Addeo y col. (1995) reportó la aparición de un fragmento 80-199 de la α_{s1} -CN por acción de la plasmina, denominado la α_{s1} PL -CN, en quesos. La κ -CN es resistente a la acción de la plasmina (Bastian, e. y R. Brown, 1996), al parecer debido a la glicosilación. En ausencia de la fracción carbohidrato aumenta levemente la susceptibilidad a la hidrólisis.

I.4.2 Enzimas de microorganismos

La refrigeración de la leche cruda, práctica difundida para evitar el desarrollo de bacterias mesófilas causantes de acidez, favorece el desarrollo de bacterias psicrótrofas (que en condiciones higiénicas de producción normalmente no constituyen más del 10% de la flora inicial). Estos microorganismos se definen como aquéllos cuya temperatura óptima de crecimiento es de 20-25°C pero pueden crecer a menos de 7°C. El tipo y número de microorganismos presentes es determinado por las condiciones de higiene bajo las cuales se obtiene y manipulea la leche y el tiempo de almacenamiento a bajas temperaturas antes del tratamiento térmico; a partir de un recuento inicial de 10^4 ufc de psicrótrofos/ml se pueden exceder los 10^6 ufc/ml luego de 2 días a 7°C (Law et al, 1979, citado por McKellar, R. 1989). En leche obtenida en condiciones no higiénicas más del 75% de su flora puede ser psicrótrofa.

La microflora psicrótrofa citada como predominante en leche son cocos Gram (-) dentro de los cuales el género *Pseudomonas* comprende el 50%. Estos microorganismos son eliminados con temperaturas de pasteurización, pero muchas especies producen enzimas extracelulares termorresistentes hacia el final del crecimiento exponencial o en la fase de

crecimiento estacionario. Estas enzimas pueden resistir los tratamientos térmicos o reactivarse después de ellos (Cuadro N° 3).

Existen resultados diversos en cuanto al número de microorganismos necesario para obtener cambios detectables en las caseínas. Snoeren y col (1979) partiendo de leche con 2070 ufc/ml llegaron a 2.060.000 ufc/ml luego de 120 hs (5 días) de incubación a 4°C. A partir de estas calidades extremas elaboraron leches UAT (142°C 4 s) por método directo (inyección de vapor en contacto con la leche) y las almacenaron a 28°C, obteniendo coagulación de la leche en 18-21 días para las de alto recuento y en 91-94 días para las de bajo recuento, aún cuando el contenido de caseína en ambos casos había caído abruptamente (20% en 20 días en la leche de alto recuento y 20% en 40 días en las de bajo recuento). Es decir que habiendo llegado ambas al mismo nivel de caseína final, las de alto recuento floccularon mientras que en las de bajo recuento siguió bajando su contenido de caseína y floccularon a los 94 días. La explicación se debería a las tasas de desaparición de las distintas caseínas. En las de alto recuento a los 20 días de almacenamiento había desaparecido completamente la κ -CN. En la leche de bajo recuento a los 60 días ya habían desaparecido la α S2-CN y la β -CN pero luego de casi 100 días de almacenamiento todavía existía el 40% de la cantidad inicial de κ -CN.

Se ha reportado daño por psicrótrofos en leche con un rango de 10^2 a 10^8 ufc/ml. Yan y col (1983) (citado por Auldíst y col, 1996) menciona valores de 10^8 ufc/ml en leche o superiores para detectar diferencias en rendimiento y calidad de quesos. En general se citan valores superiores a 10^6 ufc/ml para que ocurran cambios detectables en la leche (McKellar, R., 1989), aunque algunos autores (Patel y Blankenagel, 1972; Smith y col., 1972, citados por McKellar, R., 1989) encuentran aceptables, es decir sin alteraciones indeseables, leches con altos recuentos por lo que sugieren que el número de bacterias no es tan importante como el género de las mismas y las especies dentro de un género. La mayor parte de estos estudios se han llevado a cabo inoculando cepas y no considerando la flora natural de la leche.

El ambiente físico donde crecen las psicrótrofas afecta la producción de enzimas y su actividad, siendo la leche un medio excelente para ello. Dado que pequeñas cantidades de enzimas pueden seguir actuando en condiciones subóptimas por largos períodos y causar daños, interesa conocer los valores óptimos pero también los mínimos, de los parámetros estudiados que modifican la actividad enzimática (McKellar, R., 1989).

Respecto a la temperatura óptima de producción de proteasas por *Pseudomonas fluorescens* (especie predominante dentro de las

psicrótrofas en leche), Mc Kellar (1981) (citado por McKellar, R., 1989) reporta valores igualmente altos a 5 y a 20°C, mientras que Juffs et al (1968, citado por McKellar, R., 1989) encontró una disminución en la producción de enzimas cuando la temperatura de incubación se redujo de 20 a 5°C. Cliffe y Law (1982) (citado por McKellar, R., 1989) reporta considerable crecimiento pero baja producción de enzimas a 30°C.

En relación con la actividad enzimática, algunos autores (Juffs, 1976, Milliere y Veillet-Poncet, 1979, Pansare y col, 1986; citados por McKellar, R., 1989), reportan que las proteinasas de las pseudomonaceae son más activas en el rango de 37 a 45°C. Stepaniak y Daly (1982) (citado por McKellar, R., 1989) reportan que la proteinasa de *P. fluorescens* AFT 36 retuvo aproximadamente 30% de la actividad máxima a 7°C y 16% a 4°C. Adams y col (1975) (citados por McKellar, R., 1989) encontraron considerable actividad de la proteinasa de *Pseudomonas* MC 60 luego de 3 meses de almacenamiento a temperatura ambiente.

El rango de pH reportado de máxima actividad para las proteinasas de *P. fluorescens* y *P. fragi* es 6.5 a 8, siendo considerable al pH normal de la leche (6.7-6.8) (McKellar, R., 1989).

I.4.2.1 Efectos de las enzimas microbianas sobre las caseínas

Estas enzimas degradan principalmente la κ -caseína (κ -CN) en la unión fenilalanina-metionina (105-106), en una acción similar a la quimosina del cuajar del ternero (Law, 1979; Driessen, 1983), dando dos péptidos: el caseíno-macropéptido (CMP), fragmento 106-169 soluble y por lo tanto presente en el suero luego de la precipitación de caseínas y el fragmento 1-105 ó para- κ -caseína que permanece asociado a las micelas y cuya migración se produce, en electroforesis en gel de poliacrilamida, hacia el cátodo (al pH de migración está cargada positivamente). La forma micelar de esta caseína es más sensible que la forma soluble o disociada; en el caso de las α_{s1} -CN y β -CN la hidrólisis comienza luego de la remoción del fosfato de calcio coloidal por solubilización a bajas temperaturas, ello produce la disociación de la micela y la subsiguiente proteólisis.

La β -CN es degradada en menor proporción que la κ -CN y las α_{S1} -CN y las α_{S2} -CN prácticamente no sufren alteración por las proteinasas bacterianas.

I.4.3 Efectos sobre las proteínas del suero

Las proteínas del suero no son degradadas o lo son lentamente debido a su estructura terciaria que torna inaccesibles las uniones peptídicas (Eigel, W.N, 1977 citado por McKellar, R., 1989; Law, 1979; De Koning y col, 1981, citado por Guinot-Thomas, P., 1995a; Ravanel, C., 1988), aunque se citan disminuciones de 30-40% en la concentración de estas proteínas luego de 9 días de almacenamiento a 7°C (Gebre-Egziabher y col, 1980, citado por Guinot-Thomas, P., 1995a).

I.5 Metodología para determinar proteolisis

I.5.1 Electroforesis

La electroforesis es considerada una herramienta fundamental para la caracterización de macromoléculas (Cooper G., 1977) y el advenimiento de los geles de poliacrilamida la proyectó a su actual popularidad. Se basa en que moléculas, como las proteínas, que poseen una carga neta debida a la presencia de aminoácidos acídicos y básicos, pueden moverse cuando se las somete a un campo eléctrico.

La velocidad a la cual se mueven las moléculas es proporcional a la intensidad del campo y carga de la molécula e inversamente proporcional a su tamaño. Cada molécula posee una única carga y tamaño por lo que migrará a una única posición dentro del campo en una dada unidad de tiempo. Si una mezcla de proteínas se somete a electroforesis cada una de ellas se concentrará en una banda estrecha de migración en una posición única en el campo eléctrico. Cuando la migración se lleva a cabo en un gel de poliacrilamida, la estructura del gel influye en dicha migración (Cooper G., 1977).

Los geles de poliacrilamida han mostrado ser un medio estable e inerte químicamente. La matriz polimérica (poliacrilamida) se construye por reacción de acrilamida, N,N'-metilen-bis acrilamida, N,N',N,N'-

tetrametilendiamina (TEMED) y persulfato de amonio. Para la separación de moléculas de alto peso molecular se han desarrollado los geles de poliacrilamida-agarosa. Mediante el agregado de agarosa que actúa como soporte se obtienen geles con pequeñas cantidades de acrilamida y grandes poros.

El colorante más utilizado en la tinción de proteínas es el Azul de Coomassie. La tinción se efectúa luego de la fijación de las proteínas.

Existe en la literatura internacional abundante información respecto a la caracterización y seguimiento de la fracción nitrogenada de los productos lácteos mediante el estudio de las caseínas por electroforesis, especialmente en quesos durante su maduración. Este método permite obtener un perfil donde se pueden evidenciar las bandas correspondientes a los distintos tipos de caseínas y sus productos de hidrólisis, aunque con esta técnica son de difícil resolución los péptidos de bajo peso molecular (Bican y Spahni, 1993; Lopez-Fandiño y col., 1993b) y no se adapta a procedimientos automáticos (Lopez-Fandiño y col., 1993b).

La mayoría de las proteínas, a pH 8.6, están cargadas negativamente. Cuando se aplica el voltaje constante, las proteínas comienzan a migrar hacia el ánodo. Como se dijo, esto no se cumple para la para- κ -CN que

migra hacia el cátodo ya que a dicho pH está cargada positivamente.

1.5.2 TNBS

En 1960 Satake y col. introducen el método del 2,4,6-trinitrobenzensulfónico (TNBS) que desde entonces ha sido ampliamente utilizado para la determinación de grupos amino libres. El TNBS no reacciona con los grupos imino de la histidina y prolina o con los grupos hidroxil de la tirosina, serina o treonina, por lo que ha sido aceptado como un reactivo selectivo para grupos amino primarios libres (Ravanel, 1988). Es un método espectrofotométrico del cromóforo formado por reacción del TNBS con aminas primarias. Sus ventajas son la rapidez en la determinación y la posibilidad de analizar un gran número de muestras simultáneamente (Ravanel, 1988).

El procedimiento general es la separación de los productos de proteólisis y el sustrato no degradado precipitando con TCA (ácido tricloroacético) seguido por filtración o centrifugado. Luego en el sobrenadante se detectan los productos de proteólisis en la fracción soluble en TCA, indirectamente por combinación con el reactivo. Es decir se mide la absorbancia del cromóforo formado y se transforma a $\mu\text{moles/ml}$ de grupos amino libres solubles en TCA usando una curva standard de

glicina. Las desventajas asociadas con éste método incluyen la necesidad de agregados múltiples de reactivos para iniciar y terminar las reacciones; la reacción debe proceder en la oscuridad y los valores de absorbancia de los reactivos son altos (MacKellar, 1989).

Este método fue capaz de detectar proteolisis en leche UAT tratada con proteinasas antes de que ocurriera daño o cambios electroforéticos y antes que se detectaran gustos amargos en leche pasteurizada inoculada con *Pseudomonas fluorescens* 32A (MacKellar, 1989). Con este método se ha demostrado una estrecha correlación entre proteolisis y desarrollo de off-flavor en leche UAT almacenada (Collins, 1993).

1.5.3 RP-HPLC

El principio de separación de péptidos es la diferencia de distribución de los compuestos entre 2 fases no miscibles, una estacionaria y otra móvil. En el caso del RP-HPLC (cromatografía líquida de alta performance en fase reversa) la fase estacionaria es no polar y la fase móvil líquida va cambiando su polaridad de polar a no polar, por lo que los solutos van eluyéndose por orden de polaridad decreciente, siendo el mecanismo de retención debido principalmente a interacciones hidrofóbicas (Ravanel, C., 1988).

Durante los últimos 10 años este método se ha utilizado extensamente para estudiar la proteólisis durante la maduración de los quesos (Bican y Spahni, 1993; Gonzalez de Llano y col., 1995). El perfil peptídico que arroja el cromatograma se utiliza para caracterizar cada tipo de queso (Gonzalez de Llano y col., 1995).

Sus ventajas son versatilidad, cortos tiempos de análisis, separación efectiva y alta resolución, por lo cual se ha transformado en una de las técnicas básicas para separar y caracterizar los productos de proteólisis, especialmente péptidos (Bican y Spahni, 1993; Gonzalez de LLano D., 1995).

I.6 Consecuencias para la industria láctea de la proteólisis en leche cruda

Las variaciones de los equilibrios salinos, de la concentración de fosfato de calcio coloidal y de las proporciones correspondientes a las caseínas individuales, tienen influencia directa sobre la agregación de las submicelas para formar las micelas, sobre las dimensiones de las micelas y sobre su grado de dispersión coloidal que determina, finalmente, la estabilidad frente a los tratamientos a los que la leche es sometida en la industrialización, principalmente estabilidad al tratamiento térmico (Zalazar, C.A. y col., 1990).

Una práctica que impacta sobre dicha estabilidad es la refrigeración de la leche, mediante dos efectos: a) puede incrementar la cantidad de fracciones disociadas de CN y hacerlas más susceptibles a la proteólisis: la leche mantenida a 35°C tiene aproximadamente 15% de la caseína en forma soluble, cuando se enfría a 4°C las micelas se disocian y la cantidad de caseína soluble aumenta a 30% (Mac Kellar, 1989). La β -CN se disocia extensamente a bajas temperaturas porque aumenta su solubilidad y también aumenta la solubilidad del fosfato de calcio;

b) favorece el desarrollo de microorganismos psicrótrofos responsables de la aparición de proteasas microbianas termorresistentes.

Las enzimas proteolíticas son uno de los factores desestabilizantes de las micelas de caseína. Picard (1993) (citado por Picard y col, 1994) reportó leche UAT desestabilizada conteniendo una cantidad de CMP de 295 $\mu\text{g/ml}$ que correspondió a un 30% de hidrólisis de la κ -CN. En efecto, según la intensidad de degradación, se originan inconvenientes, en primer término, durante el tratamiento térmico por menor estabilidad al calor, mayores tiempos de coagulación y menor firmeza del coágulo en la elaboración de quesos (Auldish y col, 1996), menor rendimiento en quesos por pérdidas de nitrógeno en el suero (Zalazar y col, 1990; Feuillat y col, 1976 y Dousset y Levesque, 1986 citados por Picard y col, 1994) y

defectos en los productos elaborados como sabores amargos, por la presencia de péptidos con largos residuos laterales hidrofóbicos (Gillis, 1985), y fenómenos de gelificación (separación de coágulo y suero) en leche procesada a ultra alta temperatura (UAT) acortando su vida útil (Snoeren, T., 1979; Collins y col., 1993).

La industria láctea se beneficiaría al poder medir y/o caracterizar el estado de proteolisis de la materia prima a través del perfil de las fracciones nitrogenadas, antes de su derivación a los diversos tratamientos industriales, para lo cual necesita de métodos sensibles y rápidos. El registro sistemático de estos datos y el seguimiento de los perfiles en el procesamiento y en el producto terminado les permitiría además, establecer posibles relaciones causa-efecto. Sería también de suma utilidad poder determinar la relación entre el estado de proteolisis y los parámetros presuntamente asociados como recuento de células somáticas, recuento de psicrótrofas, tiempo de refrigeración.

El conocimiento de estas relaciones, evitaría pérdidas económicas importantes derivadas de la calidad defectuosa de productos finales o de tiempos de góndola disminuídos por condiciones desfavorables para llegar al tiempo de almacenamiento sugerido.

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

II. 1 HIPOTESIS

- Las fracciones nitrogenadas de las leches crudas de la zona de producción muestreada tiene perfiles característicos.
- Los perfiles nitrogenados de la leche cruda varían cuando ésta es sometida a tratamiento térmico.
- Los perfiles nitrogenados de la leche cruda varían cuando ésta es sometida a refrigeración.
- Los métodos propuestos, que permiten obtener un perfil diagnóstico de la presencia de proteolisis, no son igualmente sensibles.
- Existe una relación entre los perfiles nitrogenados de las leches crudas obtenidos por los métodos utilizados y parámetros tales como recuento de psicrótrofos, nivel de células somáticas y días en refrigeración.
- Se puede predecir, a partir de la evaluación del perfil nitrogenado, el comportamiento de la leche cruda en proceso y su vida útil potencial.

II.2 OBJETIVOS

- Describir los perfiles nitrogenados característicos de las leches ensayadas utilizando los métodos de: HPLC, electroforesis en gel de poliacrilamida y colorimetría por TNBS.
- Determinar posibles relaciones causa-efecto entre los perfiles nitrogenados de las leches y parámetros presuntamente asociados con la ocurrencia de proteolisis, como recuento de psicrótrofos, recuento de células somáticas, tiempo de refrigeración.
- Sugerir una metodología aplicable en la industria para predecir el comportamiento de la materia prima durante el proceso y su vida útil.

III. MATERIALES Y METODOS

Muestras de leche:

Las muestras de leche cruda bovina de vacas Holando Argentina fueron provistas por usinas lácteas que reciben materia prima de las cuencas lecheras Abasto Norte y Sur de Buenos Aires y de la provincia de Santa Fé. Fueron remitidas refrigeradas a 4°C, dentro de las 12 hs postordeño y una vez arribadas al laboratorio fueron procesadas inmediatamente.

Con el propósito de estudiar los parámetros en condiciones de refrigeración, se analizaron dos muestras de leche cruda a 0, 2 y 8 días y cinco a 0, 2 y 6 días de refrigeración a 4°C.

Las muestras con tratamiento industrial se adquirieron en supermercado seleccionando, para las leches UAT, aquellas con fecha cercana al vencimiento.

Se analizó una muestra de leche UAT coagulada en estantería dentro del período de vida útil, de la cual se tomó una fracción del coágulo (M1) y una fracción del sobrenadante (M2) y se procesaron como se describe para todas las muestras.

Con el fin de verificar el perfil de hidrólisis, se procesaron también muestras de leche con agregado de quimosina.

Análisis microbiológicos:

Se realizó sobre muestras de leche cruda y por duplicado.

El recuento de colonias de bacterias mesófilas viables totales se efectuó luego de siembra en PCA (plate-count agar) e incubación a 30°C durante 72 hs (IDF 100B:1991) y de psicrótrofas, luego de siembra en PCA e incubación a 6.5°C durante 10 días (IDF 101A:1991). Los resultados se expresan en ufc/ml.

Mediciones de proteolisis de leche:

Los análisis fueron conducidos para determinar el perfil de la fracción nitrogenada de las muestras mediante 3 métodos:

- **Electroforesis de caseínas:**

Para separar las caseínas se precipitó la leche a pH 4.6 con ácido acético glacial mediante goteo lento, se agitó y centrifugó y se guardó el sobrenadante (nitrógeno soluble NS). Luego se resuspendió el precipitado en solución de urea 9M + β -mercaptoetanol 1% y se llevó a pH 7 con NaOH 1N.

La electroforesis horizontal se efectuó en una cuba electroforética refrigerada LKB y una fuente de poder Poomaphor sobre geles de acrilamida-bis-acrilamida-agarosa (5%-0.16%-0.8%), previamente

equilibrados a pH 8.6 con buffer tris-glicina-urea (0.075 mol/lit-0.06 mol/lit-4.5 mol/lit) y 0.2% β -mercaptoetanol (Uriel, 1966). Se realizaron diluciones de las muestras con urea-agarosa (urea 5M-agarosa 1.6%) y se sembraron 10 μ l de las mismas.

Se utilizó solución 1% de azul de bromofenol en agua como marcador de frente.

Se utilizó tris-glicina (0.12%-2.5%) como buffer de migración ajustado a pH 8.6.

La migración duró aproximadamente 2 hs 30 min con una tensión de 200V. Finalizada ésta se fijaron las proteínas sumergiendo los geles en solución de TCA 12% durante 16 hs y posteriormente se efectuó la coloración con solución del colorante Azul de Coomasie. Luego de la decoloración se deshidrataron en estufa a 37°C entre films de celofán especial.

Para la electroforesis vertical (Urea-PAGE) se utilizó un equipo Bio-Rad Miniprotean II. La migración se realizó sobre geles discontinuos de poliacrilamida-urea al 5% para la concentración de las proteínas y al 10% para la resolución, utilizando TEMED como iniciador y persulfato de amonio como catalizador de polimerización.

Se utilizó Tris-glicina (0.6%-2.88%) como buffer de migración ajustado a

pH 8.8. La dilución de las muestras se efectuó con agua bidestilada y solución desnaturizante (urea-glicerol-Tris-Azul de bromofenol- β -mercaptoetanol) y se sembraron 10 μ l de las mismas.

Luego de aproximadamente 45 min. de corrida a 30 mA/gel se efectuó la fijación y coloración de los geles del mismo modo que con los horizontales.

- **HPLC:**

Preparación de las muestras:

Las muestras se prepararon para analizar el perfil del nitrógeno soluble y del nitrógeno no proteico (soluble en TCA al 4% de concentración final).

Para nitrógeno soluble se utilizó el sobrenadante resultante de la precipitación a pH 4.6 de caseína para electroforesis, previo filtrado por filtro 0.45 μ m.

Para nitrógeno no proteico se precipitó 1 ml de muestra de leche con 0.5 ml de TCA 12% (concentración final 4%), se refrigeró 1 hora a 4 °C y centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante fue filtrado a través de filtro de 0.45 μ m.

Equipamiento:

Se utilizó un cromatógrafo líquido HPLC Shimadzu LC-10 AT con desgasificador DGU-3A y detector UV-VIS de Shimadzu SPD-10 AV. El sistema de adquisición y procesamiento de datos fue el CLASS-CR10.

Se trabajó con una columna Supelcosil LC-18 de 250 mm de longitud

Preparación de solventes:

El solvente A fue 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) en agua grado HPLC y el solvente B 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) en una solución acetonitrilo:agua (60:40 v/v), ambos grado HPLC.

La columna se equilibró con 10% del solvente B.

Condiciones de elución y detección:

λ 214 nm

flujo 1 ml/min

vol. inyección 20 μ l (loop lleno)

columna a temperatura ambiente (20-25°C)

Gradiente de B en A:

0.1 min	10%
20 min	65%
25 min	100%
30 min	100%
30.1 min	stop

- **TNBS:**

Se utilizó la técnica de Mac Kellar (1981) modificada por Vallés (1985) (citado por Ravanel, 1988).

Se precipitó cada muestra con TCA 0.72 N, se centrifugó y separó el sobrenadante (nitrógeno no proteico), al cual se agregó buffer borato de potasio 1M pH 9.2 y solución 5 mM de TNBS (ácido trinitrobenzensulfónico), se incubó a 25°C en oscuridad por 30 min, terminando la reacción por neutralización del pH con solución 18mM de sulfito de sodio y fosfato monosódico 2N. Luego se midió la densidad óptica con un espectrofotómetro a 420 nm. El blanco se realizó exactamente igual utilizando agua destilada en lugar del extracto. Se preparó una curva de calibración con soluciones de glicina de 0.2 - 0.4 - 0.8 y 1.2 μ moles/ml y la extensión de la proteolisis se expresó como mmoles/ml de glicina.

N° de células somáticas:

Se determinó sobre las muestras de leche cruda previamente homogeneizadas a 40°C, con un equipo de recuento automático (Fossomatic, Foss Electric, Hillerod, Dinamarca) basado en el método del microscopio fluorescente, que consiste en la tinción del núcleo de la célula

con bromuro de etidio cuyo resultado es un complejo que emite una luz fluorescente roja. El principio se llama recuento fluoro-opto-electrónico de células.

El resultado se expresó como recuento de células somáticas totales por ml (RCS/ml).

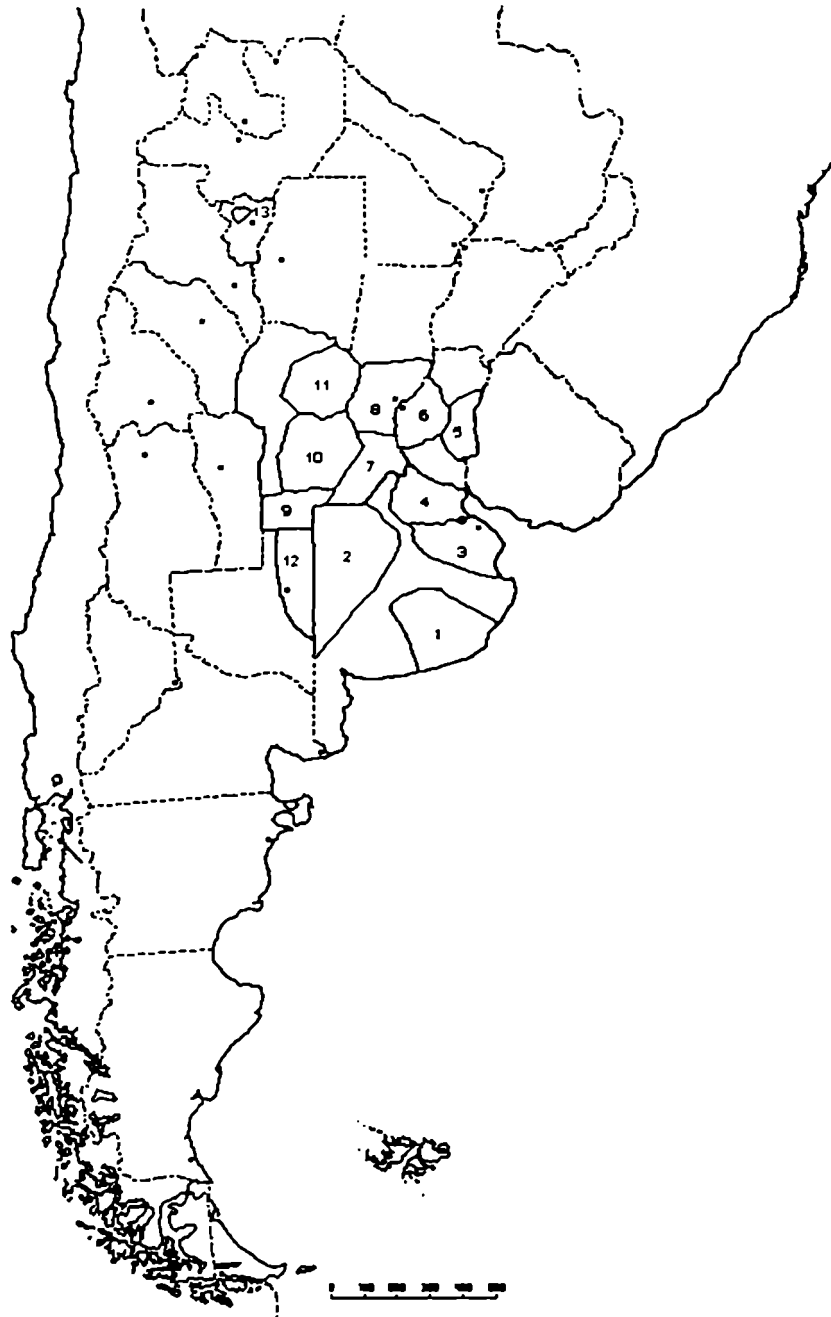
PH:

Fue medido utilizando un medidor de pH ORION RESEARCH, modelo 407A.

Absorbancia:

Se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS Spectronic 21 Bausch & Lomb.

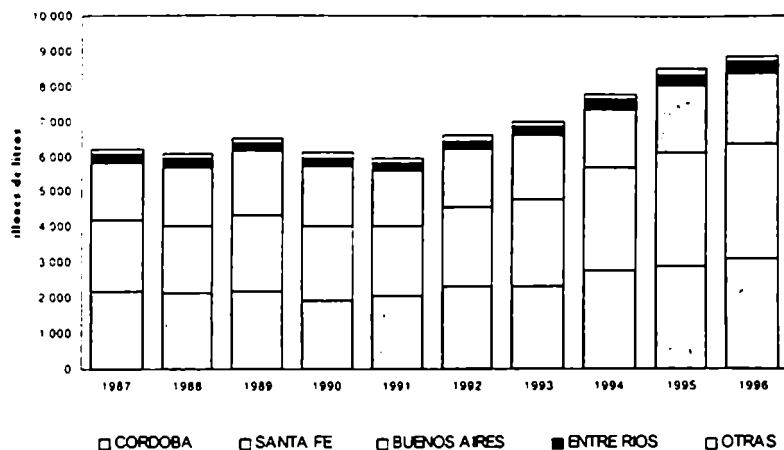
MAPA N° 1



- | | | | | |
|---------------|------------------------|------------------|----------------|-----------------|
| BUENOS AIRES: | 1. Mar y Sierras. | 2. Oeste. | 3. Abasto Sur. | 4. Abasto Norte |
| ENTRE RIOS: | 5. Cuenca "B". | 6. Cuenca "A". | | |
| SANTA FE: | 7. Sur. | 8. Central. | | |
| CORDOBA: | 9. Sur | 10. Villa María. | 11. Noreste | |
| LA PAMPA: | 12. La Pampa. | | | |
| TUCUMAN: | 13. Cuenca de Trancas. | | | |

GRÁFICO N°1. Evolución de la participación relativa de Bs. As., Santa Fé y Córdoba en la producción nacional en la última década.

Participación provincial en la producción



PROVINCIA DE SANTA FE	1988	1995
Producción (litros)	1.508.937.984	2.301.177.844
Número de Tambos	8.715	5.664
Vacas Totales	17.244	40.444

FUENTE: M.A.G.I.C., 1995. Relevamiento de tambos.

PROVINCIA DE CORDOBA	1988	1995
Producción (litros)	1.741.988.113	2.345.644.349
Número de Tambos	10.102	6.891
Vacas Totales	658.363	739.092

FUENTE: Año 88: Tambos: S.A.G. y R.N. de la provincia. Vacas: CNA '88
Año '95: ESIL-APIL

PROVINCIA DE BUENOS AIRES	1988	1995
Producción (litros)	1.369.399.691	1.518.400.552
Número de Tambos	6.969	(*) 4.699
Vacas Totales	652.858	592.074

(*) 1996

FUENTE: Año 88: CNA '88
Año 95: M.A.A.

PROVINCIA DE ENTRE RIOS	1988	1995
Producción (litros)	195.333.577	245.211.974
Número de Tambos	4.055	2.500
Vacas Totales	108.947	s / d

FUENTE: Año 88: CNA '88
Año '95: estimación DIPRODESA

PROVINCIA DE LA PAMPA	1988	1995
Producción (litros)	53.356.758	81.629.180
Número de Tambos	300	250
Vacas Totales	19.969	14.351

FUENTE: Año 88: CNA '88
Año '95; estimación en base del Ministerio Asuntos Agrarios de la provincia

GRÁFICO N°2. Concentración industrial por provincia.

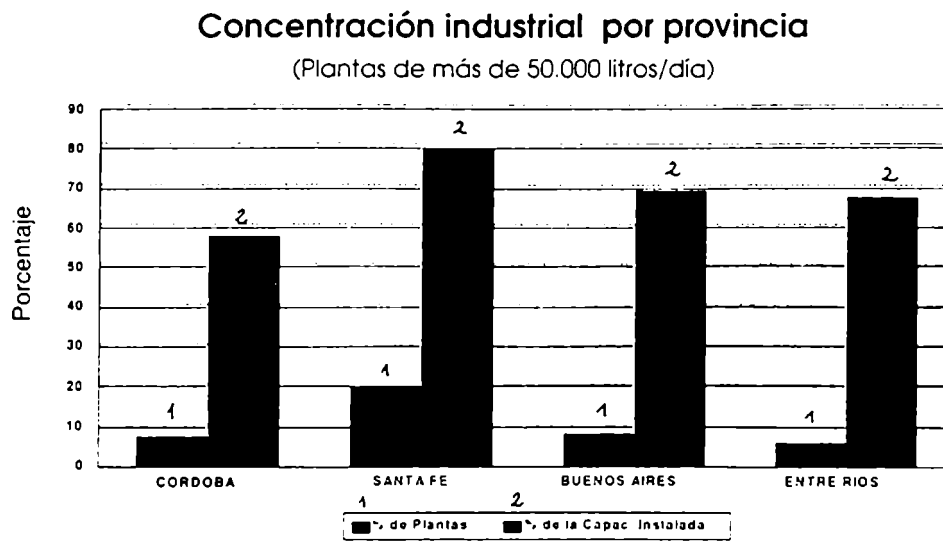
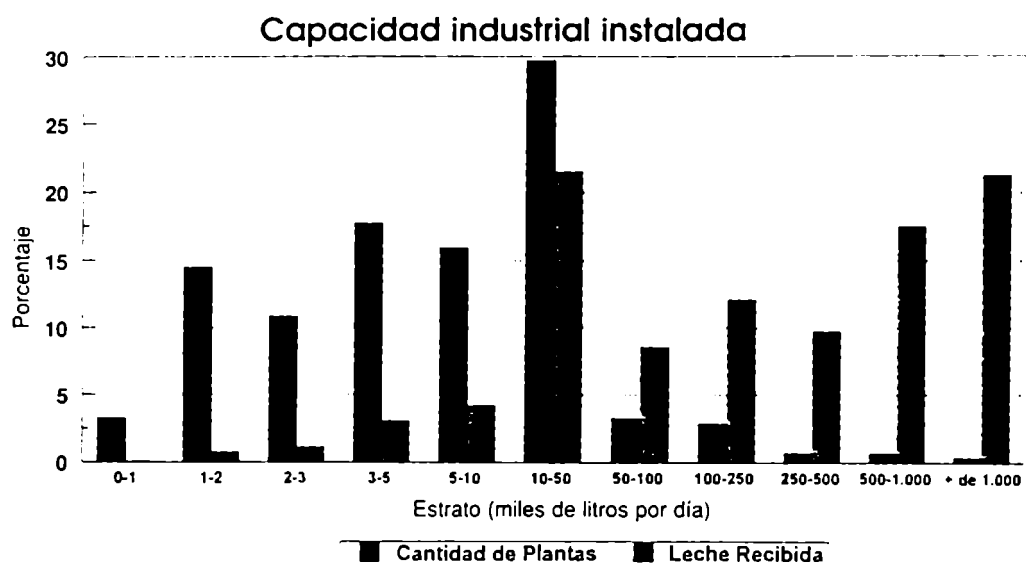


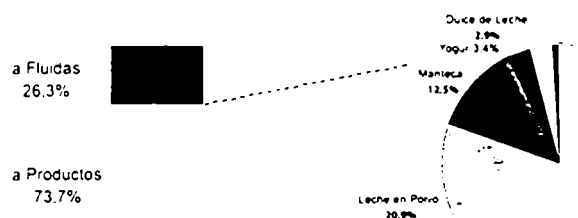
GRÁFICO N°3. Capacidad industrial instalada de la pvcia. de Buenos Aires.



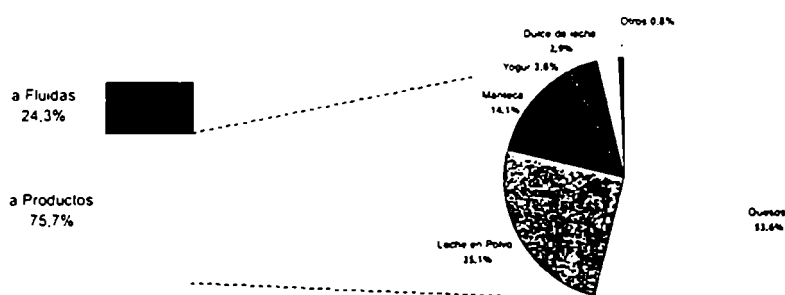
Fuente: *Departamento de Lechería - SAPyA. (1995).*
Dpto. de Fiscalización Ganadera - SENASA. (1995).
Ministerio de Asuntos Agrarios. (1994).

GRÁFICO N° 4. Destinos de la leche en los últimos años.

Producción Promedio 91-95: 7.163 millones de litros



Producción 1995: 8.507 millones de litros



Producción 1996: 8.865 millones de litros

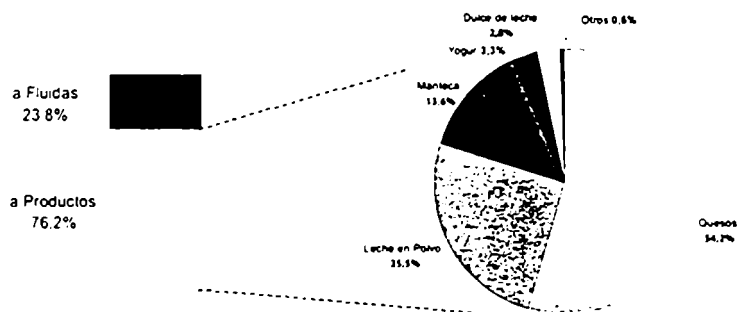
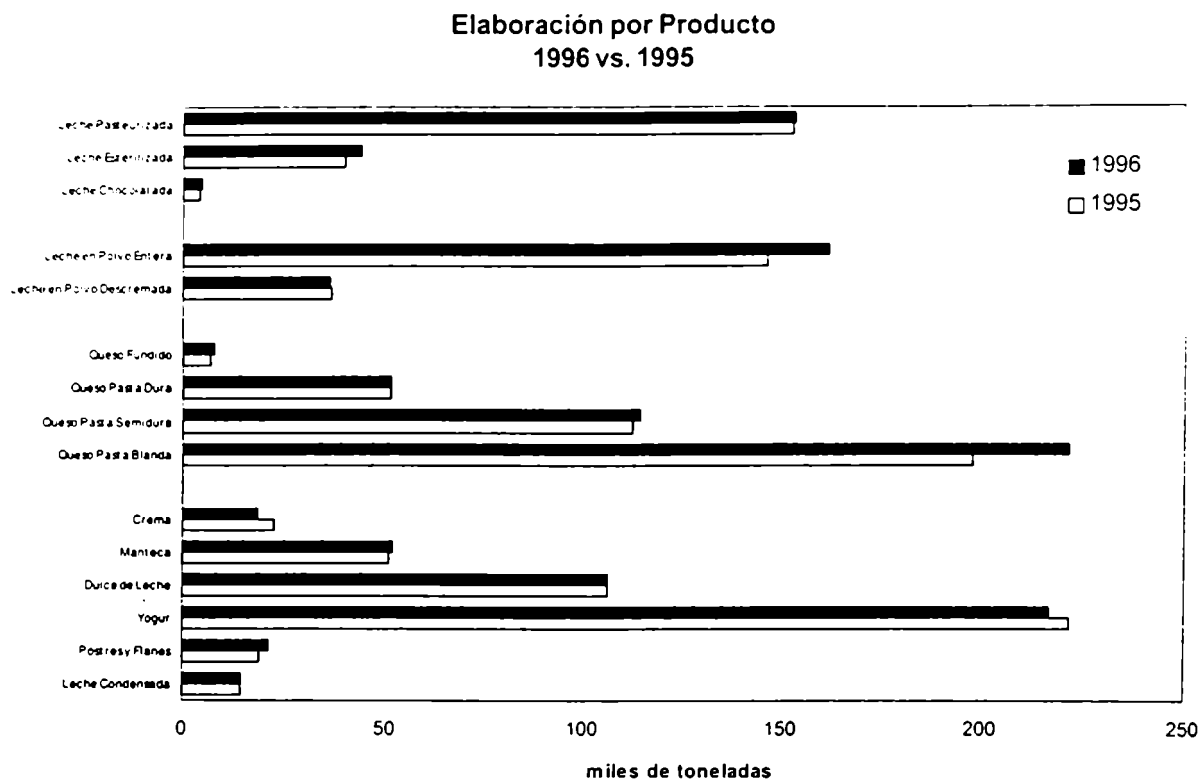


GRÁFICO N° 5. Elaboración de productos. Comparación 1996 - 1995.



Nota: Leches Fluidas se expresan en equivalente leche en polvo.

Puede hacerse la siguiente clasificación:

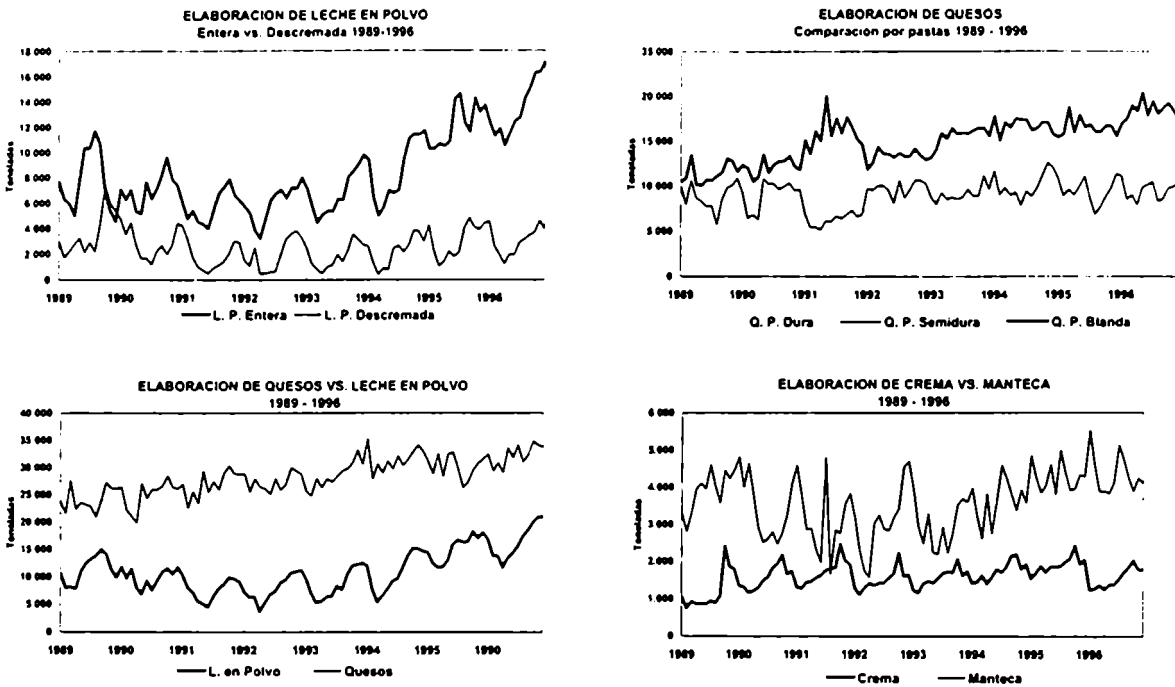
Productos que presentan importantes crecimientos:

Suero (+ 47%)	Queso Fundido (+ 14%)
Caseína (+ 14%)	Quesos de Pasta Blanda (+ 12%)
Postres y Flanes (+ 11%)	Leche esterilizada (+ 11%)
Leche en Polvo Entera (+ 10,5%)	Leche Chocolatada (+ 8%)

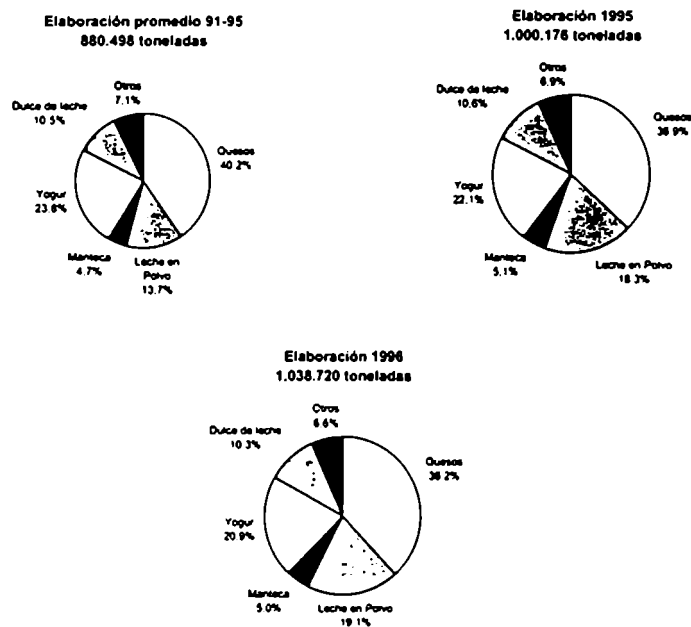
Productos que presenta aumentos más moderados, entre ellos, Manteca, Quesos de Pasta Semidura y Dura, Leche Pasteurizada y Dulce de Leche.

Productos cuya elaboración ha disminuido, en especial Caseinatos, Crema y Yogur.

GRÁFICO N° 6. Evolución de la elaboración de productos desde 1989.



Como complemento, se realiza a continuación una comparación de la elaboración del año 1996 con el periodo anterior y el promedio del quinquenio 91-95. Debe aclararse que se excluyen de este análisis a las Leches Fluidas (Pasteurizada, Esterilizada y Chocolatada).



CUADRO N° 1. Evolución de la producción y del consumo aparente de leche desde 1981.

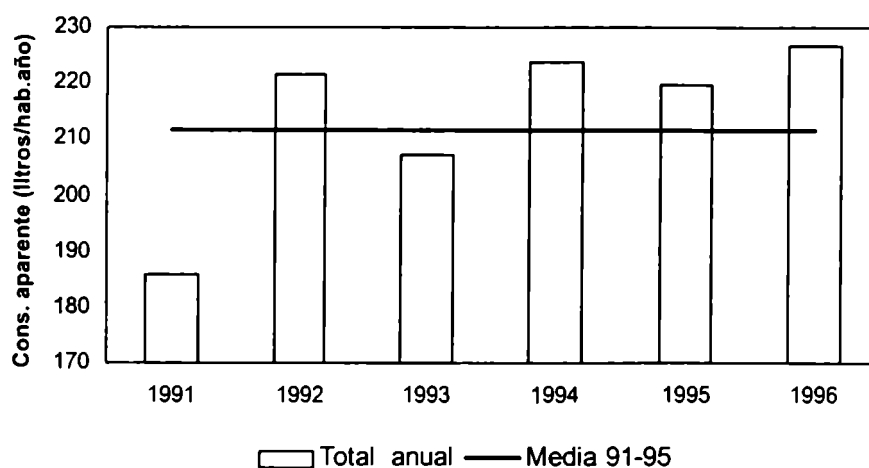
Producción per capita y consumo aparente de leche por habitante

Año	Producción (millones)	Habitantes (millones)	Producción per cápita (1) (litros/hab.)	Exportación (millones)	Importación (millones)	Consumo Aparente (2) (litros/hab.)
1981	5.092	28,64	177,8	111	145	178,9
1982	5.487	29,05	188,9	340	10	177,5
1983	5.697	29,46	193,4	379	14	181,0
1984	5.341	29,86	178,8	100	31	176,5
1985	5.962	30,27	197,0	78	20	195,1
1986	5.721	30,68	186,5	137	71	184,3
1987	6.190	31,08	199,1	91	122	200,1
1988	6.061	31,49	192,5	438	62	180,5
1989	6.520	31,91	204,3	870	5	177,2
1990	6.093	32,30	188,7	950	23	160,0
1991	5.937	32,69	181,6	403	540	185,8
1992	6.591	33,38	197,5	57	857	221,4
1993	7.002	33,78	207,3	306	301	207,1
1994	7.777	34,18	227,0	527	391	223,6
1995	8.507	34,77	244,7	1.094	227	219,7
1996	8.865	35,22	251,7	1.118	238	226,7

(1) Producción nacional / Población

(2) (Producción + Importación - Exportación) / Población

Evolución del consumo aparente de lácteos 1991 - 1996

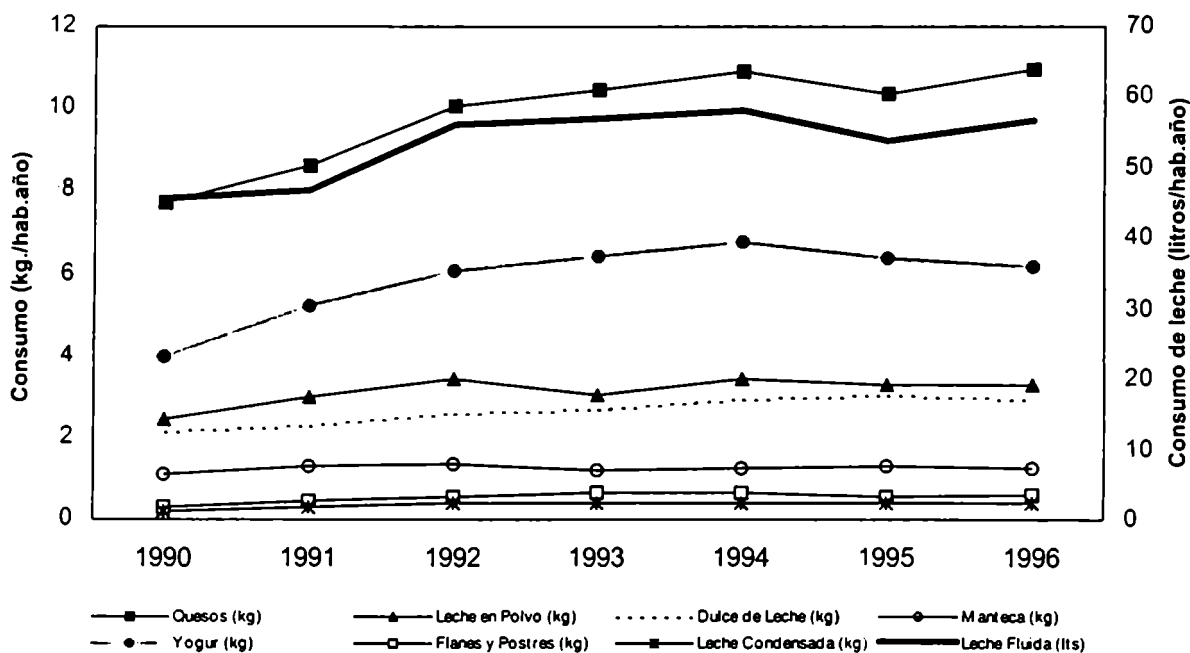


CUADRO N° 2. Evolución del consumo de algunos productos lácteos.

Consumo por habitante de algunos productos lácteos

Producto	1980	1985	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
Leche Fluida (lts)	56.80	52.10	45.70	46.90	56.00	57.00	58.00	53.76	56.60
Quesos (kg)	9.20	7.80	7.70	8.63	10.06	10.46	10.88	10.37	10.96
Leche en Polvo (kg)	2.20	3.40	2.46	2.99	3.42	3.05	3.44	3.29	3.29
Dulce de Leche (kg)	1.80	2.10	2.15	2.27	2.60	2.67	2.96	3.04	2.93
Manteca (kg)	1.20	1.00	1.12	1.27	1.32	1.18	1.25	1.30	1.25
Yogur (kg)	1.80	2.30	3.97	5.25	6.09	6.43	6.77	6.39	6.17
Flanes y Postres (kg)	0.40	0.40	0.31	0.46	0.57	0.65	0.64	0.56	0.60
Leche Condensada (kg)	0.30	0.20	0.19	0.30	0.40	0.40	0.41	0.42	0.41

Consumo de algunos productos lácteos 1990-1996



Crecimiento del consumo 1991-1996

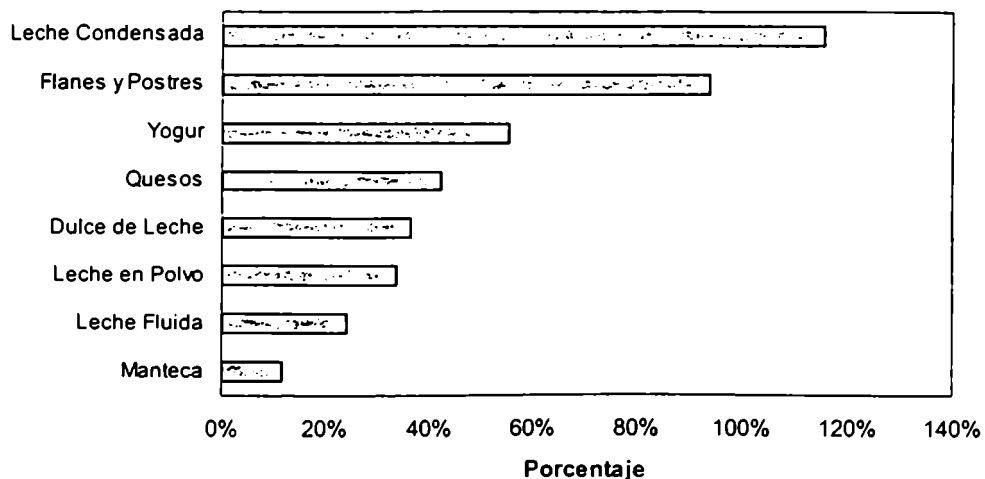
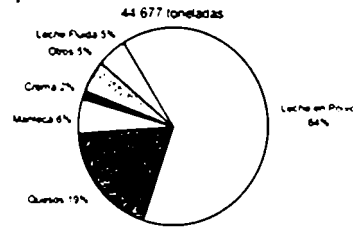
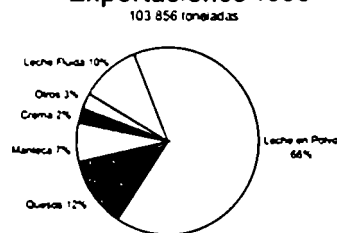


GRAFICO N° 7. Participación de los principales productos en el total exportado.

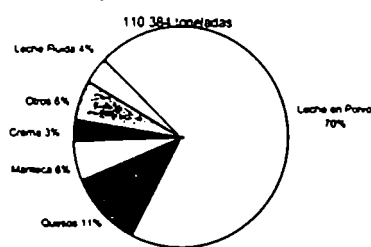
Exportaciones Promedio 91 - 95



Exportaciones 1995



Exportaciones 1996



- . El principal producto exportado continua siendo la Leche en Polvo, seguido por los Quesos.
- . La Leche en Polvo continúa incrementando su importancia relativa (creció un 6% entre 1995 y 1996). En oposición, se registraron bajas en la participación de Quesos y Leches Fluidas.

El incremento en las leches en polvo se ha producido fundamentalmente en la leche en polvo entera.

En el siguiente gráfico se observa el ranking comparativo de los principales productos exportados.

Exportaciones 96 vs. 95
10 principales productos

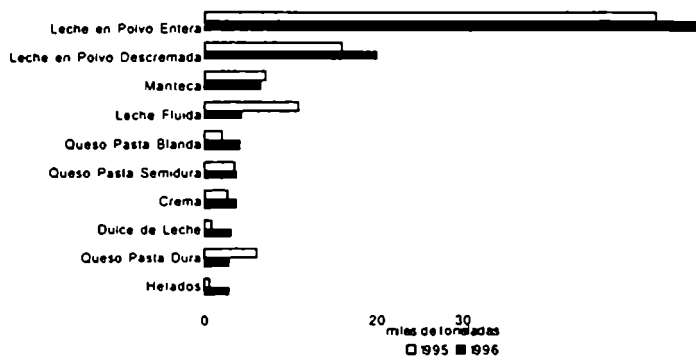


GRAFICO N° 8 . Relación Exportación/Elaboración durante 1994 y 1995.

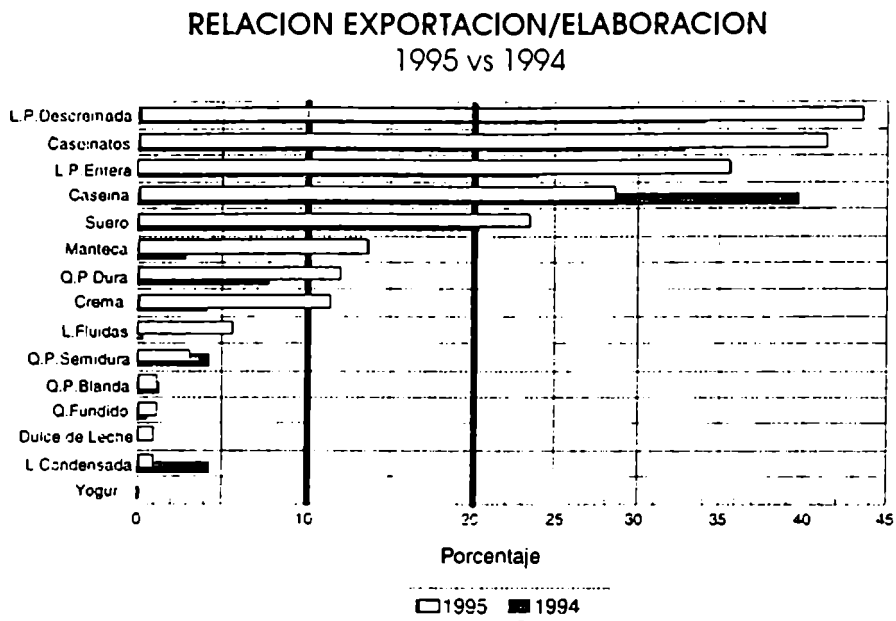
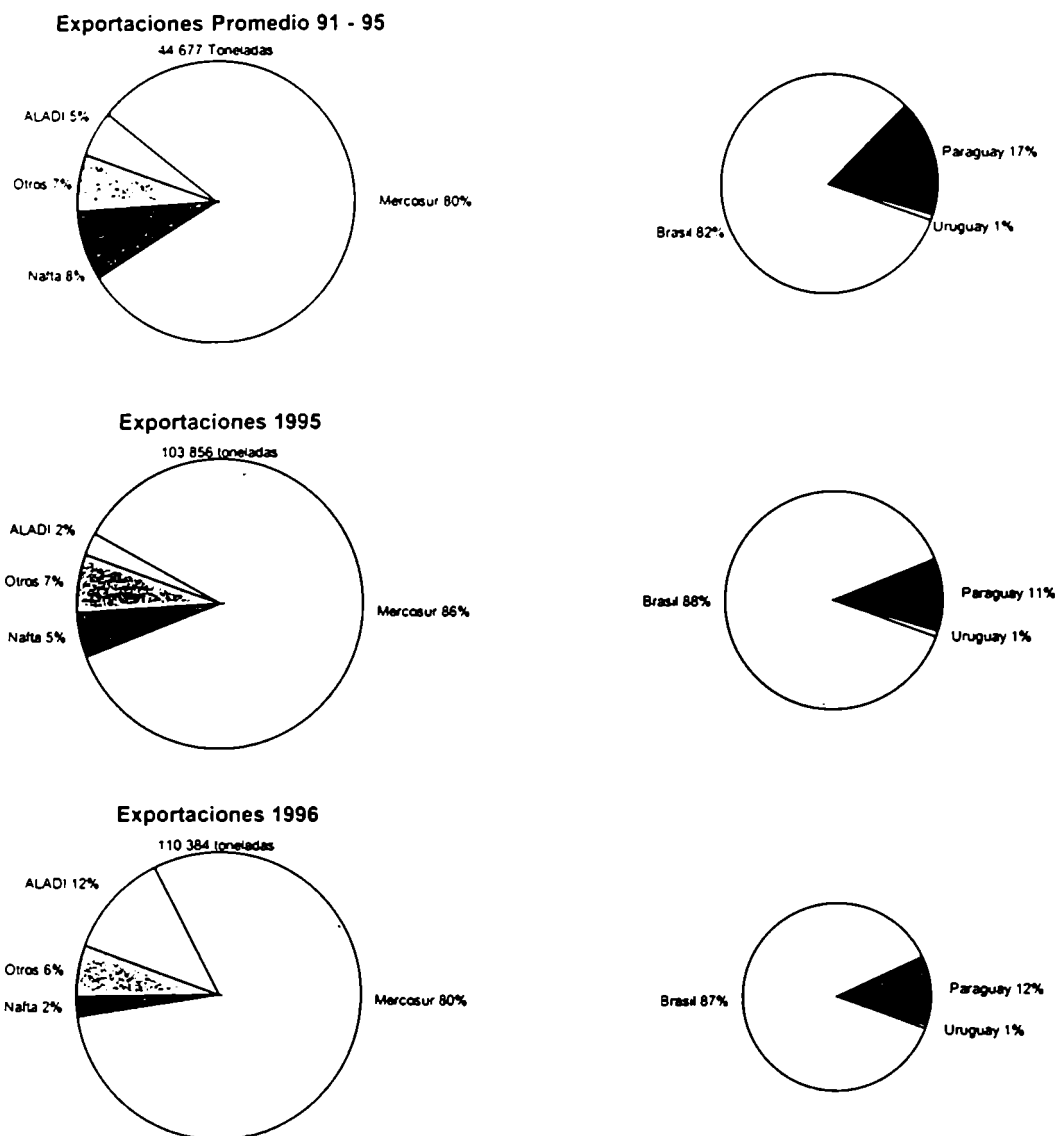


GRAFICO N° 9 Principales países destino de las exportaciones.



EXPORTACIONES LACTEAS AÑO 1996, por bloques

País	Bloque	toneladas	%	miles de us\$	%
Brasil	Mercosur	77 466.2	70.2%	202.999.5	70.3%
Paraguay	Mercosur	10.478.6	9.5%	31.914.6	11.0%
Chile	ALADI	4.901.8	4.4%	10.722.4	3.7%
Peru	ALADI	3.539.5	3.2%	7.725.5	2.7%
EE UU	Nafta	2.379.8	2.2%	9.002.3	3.1%
Bolivia	ALADI	2.333.5	2.1%	6.609.5	2.3%
Venezuela	ALADI	2.081.3	1.9%	5.309.7	1.8%
Tailandia	PECC	1.460.0	1.3%	3.009.3	1.0%
Países Bajos	Unión Europea	1.161.0	1.1%	2.318.2	0.8%
Marruecos	Otros	1.000.0	0.9%	1.950.0	0.7%
Siria	Medio Oriente	886.5	0.8%	748.2	0.3%
Alemania	Unión Europea	645.3	0.6%	1.134.7	0.4%
República Dominicana	Otros	510.0	0.5%	1.132.6	0.4%
Uruguay	Mercosur	485.1	0.4%	1.239.2	0.4%
Belgica	Unión Europea	474.0	0.4%	924.3	0.3%
Colombia	ALADI	223.0	0.2%	502.5	0.2%
Italia	Unión Europea	103.3	0.1%	470.7	0.2%
España	Unión Europea	81.7	0.1%	132.2	0.0%
Rusia	CEI	80.7	0.1%	133.2	0.0%
Canadá	Nafta	75.9	0.1%	272.8	0.1%
Francia	Unión Europea	55.9	0.1%	128.9	0.0%
México	Nafta	50.2	0.0%	214.9	0.1%
Israel	Medio Oriente	48.5	0.0%	78.3	0.0%
Japón	PECC	45.0	0.0%	191.9	0.1%
Reino Unido	Unión Europea	8.3	0.0%	20.5	0.0%
Otros	Otros	5.0	0.0%	7.5	0.0%
Suiza	AELC	3.2	0.0%	7.0	0.0%
Austria	Unión Europea	1.2	0.0%	3.2	0.0%
TOTAL		110.384.5	100%	288.903.4	100%

FUENTE: INDEC

GRAFICO N° 10 . Exportaciones lácteas 1996 por país y por producto en toneladas.

EXPORTACIONES LACTEAS AÑO 1996, por país y producto

Toneladas	Dulce de Leche		Helados		Leches Fluidas		Leche Condensada		Leche en Polvo		Suero	Manteca	Queso Pasa				Queso			TOTAL	%
	Crema	de Leche	Helados	Fluidas	Condensada	Entera	Descremada	Entera	Dura	Semidura			Blanda	Fundido	Rallado	Yogur	Caseinato				
Brasil	3 442,8	109,6	2 300,4	4 215,3	68,4	17 756,6	40 767,2	56,0	1 957,7	795,5	1 963,6	3 023,4	0,2	998,7	14,0	77 466,2	70,2%				
Paraguay	58,6	1 456,5	202,9	16,2	193,0	246,6	5 570,4	68,6	87,5	88,1	1 335,1	754,6	57,6	234,3	108,6	10 476,6	9,5%				
Chile	6,5	17,0	-	0,4	13,2	461,0	3 151,1	0,2	1 125,0	37,2	26,1	48,5	4,6	0,6	0,4	4 901,8	4,4%				
Peru	-	-	-	-	-	100,0	3 405,0	-	-	32,8	0,5	-	-	1,2	-	3 539,5	3,2%				
EE UU	-	47,9	-	-	-	-	-	-	24,0	1 608,3	180,6	85,5	-	433,4	-	2 379,8	2,2%				
Bolivia	31,2	270,6	-	14,4	42,2	38,2	1 703,1	-	14,4	3,1	58,7	125,2	20,3	6,7	-	2 333,8	2,1%				
Venezuela	-	-	-	0,0	-	315,0	1 766,3	-	-	-	-	-	-	-	-	2 081,3	1,9%				
Irlanda	-	-	-	-	-	950,0	510,0	-	-	-	-	-	-	-	-	1 460,0	1,3%				
Países Bajos	-	-	-	-	-	-	-	-	1 116,0	45,0	-	-	-	-	-	1 161,0	1,1%				
Marruecos	-	-	-	-	-	-	-	-	1 000,0	-	-	-	-	-	-	1 000,0	0,9%				
Siria	-	686,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	686,5	0,6%				
Alemania	-	2,4	-	-	-	-	-	-	504,0	30,0	-	-	-	-	109,0	645,3	0,6%				
Republca Dominicana	-	-	-	-	-	-	510,0	-	-	-	-	-	-	-	-	510,0	0,5%				
Uruguay	0,0	71,6	290,0	28,1	16,8	5,5	10,1	-	18,7	0,3	-	15,4	7,5	15,3	-	485,1	0,4%				
Bélgica	-	-	-	-	-	-	205,0	-	474,0	-	-	-	-	-	-	474,0	0,4%				
Colombia	-	-	-	-	-	-	-	-	18,0	-	-	-	-	-	-	223,0	0,2%				
Italia	-	13,3	-	-	-	-	-	-	-	90,0	-	-	-	-	-	103,3	0,1%				
España	-	81,5	0,1	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	81,7	0,1%				
Rusia	-	80,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80,7	0,1%				
Canadá	-	9,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	75,9	0,1%				
Francia	-	3,9	-	-	-	-	-	-	52,0	66,8	-	-	-	-	-	55,9	0,1%				
México	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36,0	-	-	-	-	-	50,2	0,0%				
Israel	-	48,5	-	-	-	-	-	-	-	-	14,1	-	-	-	-	48,5	0,0%				
Japón	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45,0	-	-	-	-	-	45,0	0,0%				
Reino Unido	-	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,3	0,0%				
Otros	-	-	-	-	-	-	-	5,0	-	-	-	-	-	-	-	5,0	0,0%				
Suiza	-	-	-	-	-	-	3,2	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2	0,0%				
Austria	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2	0,0%				
TOTAL	3 539,1	2 908,7	2 793,3	4 274,3	333,6	19 872,9	57 596,5	132,0	8 391,3	2 877,9	3 564,5	4 066,8	90,2	1 490,2	114,1	110 384,5	100%				
%	3,2%	2,6%	2,5%	3,9%	0,3%	18,0%	52,2%	0,1%	5,8%	2,8%	3,2%	3,7%	0,1%	1,5%	0,1%	100%					

NOTA: Las Leches Fluidas están expresadas en su equivalente leche en polvo.

GRAFICO N° 11 . Exportaciones lácteas 1996 por país y por producto en miles de dólares.

EXPORTACIONES LACTEAS AÑO 1996, por país y producto

Miles de us\$	Dulce de Leche		Leches		Leche en Polvo		Manteca			Queso Pasta			Queso			TOTAL	%
	Crema	Helados	Fluidas	Condensada	Descremada	Entera	Suero	Dura	Samidura	Blanda	Fundido	Rallado	Yogur	Chevase	Casennatos		
Brasil	5 419,5	181,4	23 118,9	27,4	41 002,8	97 155,7	104,9	3 922,3	5 899,2	9 492,2	0,6	5 181,0	-	94,4	-	202 999,5	70,3%
Paraguay	107,5	2 106,8	102,9	273,4	765,9	18 545,4	75,1	289,0	4 377,3	2 085,0	191,5	1 781,6	90,5	-	-	31 914,6	11,0%
Chile	14,3	22,3	1,8	21,3	989,3	8 829,3	0,0	2 316,0	105,8	195,4	16,1	3,5	-	59,1	2,3	10 722,4	3,7%
EE UU	-	94,0	-	-	-	-	-	32,4	6 093,8	282,3	-	1 802,2	-	-	-	9 802,3	3,1%
Perú	-	-	-	-	200,0	7 387,4	-	-	146,9	-	-	8,8	-	-	-	7 725,5	2,7%
Bolivia	75,2	423,5	101,4	82,1	95,8	4 883,7	-	68,1	-	498,0	79,0	70,2	7,7	-	-	6 609,5	2,3%
Venezuela	-	-	0,0	-	730,0	4 579,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5 309,7	1,8%
Tailandia	-	-	-	-	1 900,0	1 109,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3 009,3	1,0%
Países Bajos	-	-	-	-	-	-	-	2 124,5	-	-	193,8	-	-	-	-	2 318,2	0,8%
Marruecos	-	-	-	-	-	-	-	1 950,0	-	-	-	-	-	-	-	1 950,0	0,7%
Uruguay	0,0	642,0	138,9	22,1	19,6	34,9	-	13,3	-	87,5	29,6	97,9	-	-	-	1 239,2	0,4%
Alemania	-	5,3	-	-	-	-	-	685,3	1,7	-	-	-	-	11,5	379,4	1 134,7	0,4%
República Dominicana	-	-	-	-	-	1 132,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 132,8	0,4%
Belgica	-	-	-	-	-	-	-	924,3	-	-	-	-	-	-	-	924,3	0,3%
Siria	-	748,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	748,2	0,3%
Colombia	-	-	-	-	-	475,8	-	28,6	-	-	-	-	-	-	-	502,5	0,2%
Italia	-	44,1	-	-	-	-	-	-	426,6	-	-	-	-	-	-	470,7	0,2%
Canadá	-	19,6	-	-	-	-	-	-	253,0	-	-	-	-	-	-	272,8	0,1%
México	-	-	-	-	-	-	-	-	161,5	-	-	-	-	-	-	214,9	0,1%
Japón	-	-	-	-	-	-	-	-	191,9	53,4	-	-	-	-	-	191,9	0,1%
Rusia	-	133,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	133,2	0,0%
España	-	131,7	0,2	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	132,2	0,0%
Francia	-	9,2	-	-	-	-	-	119,6	-	-	-	-	-	-	-	128,9	0,0%
Israel	-	78,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	78,3	0,0%
Reino Unido	-	20,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,5	0,0%
Otros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,5	0,0%
Suiza	-	-	-	-	-	7,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,0	0,0%
Austria	-	3,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2	0,0%
TOTAL	5 815,5	4 181,3	23 481,9	406,2	45 683,4	142 121,0	187,5	12 451,4	11 242,3	12 873,9	316,8	8 945,2	98,2	185,0	331,6	288 903,4	100%
%	1,9%	1,4%	8,1%	0,1%	15,9%	49,2%	0,1%	4,3%	3,9%	4,4%	0,1%	3,1%	0,0%	0,1%	0,1%	100%	

FUENTE: I.N.D.E.C.

FIGURA N° 1. Representación esquemática de la formación de micelas de caseínas.

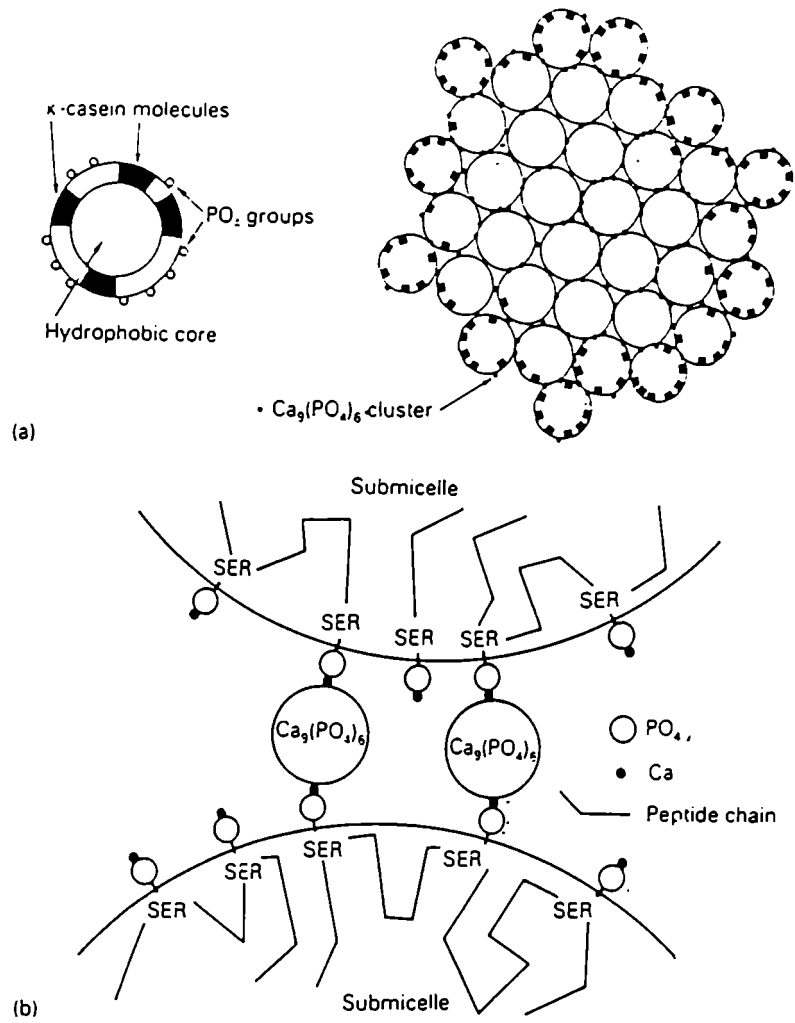
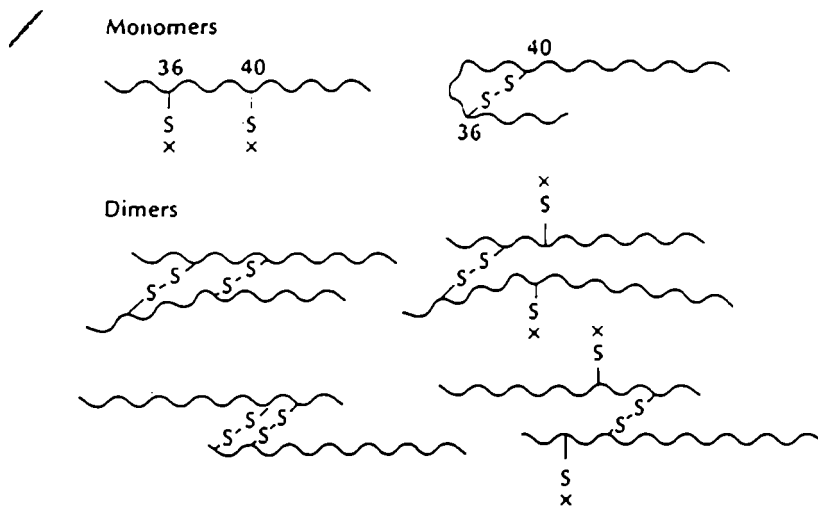


FIGURA N° 2. Estructura primaria de la α s1-CN B. Se indican con flechas las uniones peptídicas hidrolizadas por quimosina.

FIGURA N° 3. Estructura primaria de la α 2-CN A.



H. Lys-Asn-Thr-Met-Glu-His-Val-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu-Ser-Ile-Ile-Ser-Gln-Glu-Thr-Tyr-
 10 20
 P P P P
 -Lys-Gln-Glu-Lys-Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro-Ser-Lys-Glu-Asn-Leu-Cys-Ser-Thr-Phe-Cys-
 30 40
 -Lys-Glu-Val-Val-Arg-Asn-Ala-Asn-Glu-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ile-Gly-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu-
 50 60
 P P P
 -Ser-Ala-Glu-Val-Ala-Thr-Glu-Glu-Val-Lys-Ile-Thr-Val-Asp-Asp-Lys-His-Tyr-Gln-Lys-
 70 80
 P
 -Ala-Leu-Asn-Glu-Ile-Asn-Glu-Phe-Tyr-Gln-Lys-Phe-Pro-Gln-Tyr-Leu-Gln-Tyr-Leu-Tyr-
 90 100
 -Gln-Gly-Pro-Ile-Val-Leu-Asn-Pro-Trp-Asp-Gln-Val-Lys-Arg-Asn-Ala-Val-Pro-Ile-Thr-
 110 120
 -Pro-Thr-Leu-Asn-Arg-Glu-Gln-Leu-Ser-Thr-Ser-Glu-Glu-Asn-Ser-Lys-Lys-Thr-Val-Asp-
 130 140
 P P
 -Met-Glu-Ser-Thr-Glu-Val-Phe-Thr-Lys-Lys-Thr-Lys-Leu-Thr-Glu-Glu-Glu-Lys-Asn-Arg-
 150 160
 P
 -Leu-Asn-Phe-Leu-Lys-Lys-Ile-Ser-Gln-Arg-Tyr-Gln-Lys-Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr-Leu-
 170 180
 -Lys-Thr-Val-Tyr-Gln-His-Gln-Lys-Ala-Met-Lys-Pro-Trp-Ile-Gln-Pro-Lys-Thr-Lys-Val-
 190 200
 -Ile-Pro-Tyr-Val-Arg-Tyr-Leu.OH.
 207

FIGURA N° 4. Estructura primaria de la β -CN A.

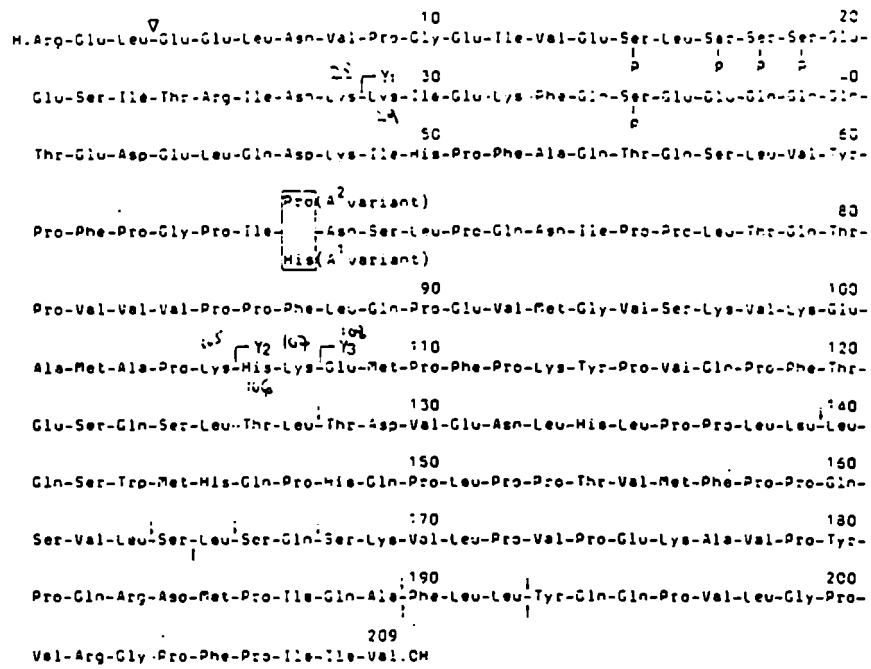
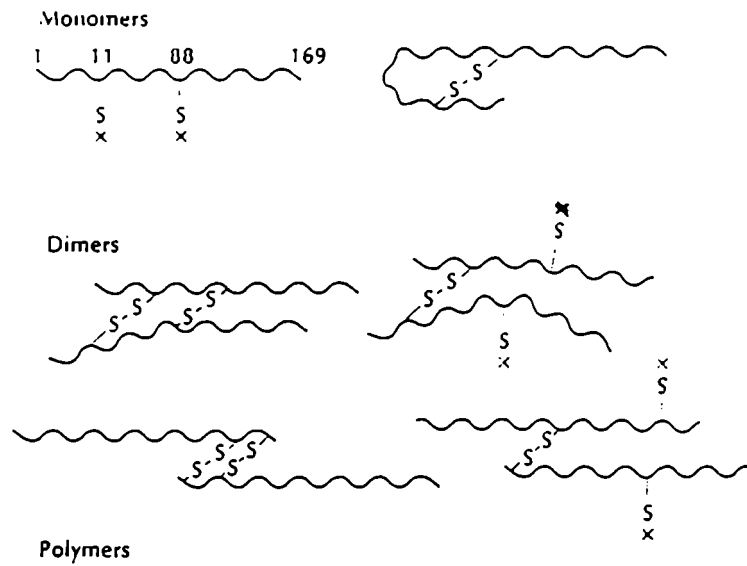


FIGURA N° 5. Estructura primaria de la κ-CN B.



Lys-Ile-Ala-Lys-Tyr-Ile-Pro-Ile-Gln-Tyr-Val-Leu-Ser-Arg-Tyr-Pro-Ser-Tyr-Gly-Leu

Asn-Tyr-Tyr-Gln-Gln-Lys-Pro-Val-Ala-Leu-Ile-Asn-Asn-Gln-Phe-Leu-Pro-Tyr-Pro-Tyr

Thr-Ile-Asn-Thr-Ile-Ala-Ser-Gly-Glu-Pro-Thr-Ser-Thr-Pro-Thr-Ile-Glu-Ala-Val-Glu

Ser-Thr-Val-Ala-Thr-Leu-Glu-Ala-Ser-Pro-Glu-Val-Ile-Glu-Ser-Pro-Pro-Glu-Ile-Asn
P

Thr-Val-Gln-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Val-OH

FIGURA N° 6 . Modelos de estructura de micelas de caseínas.

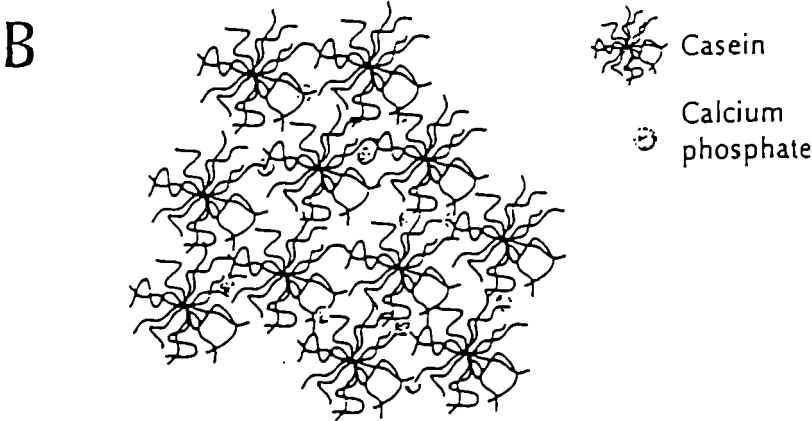
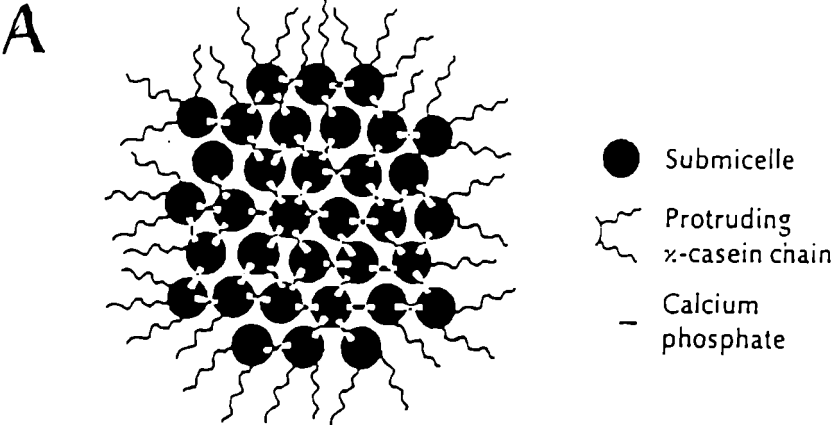
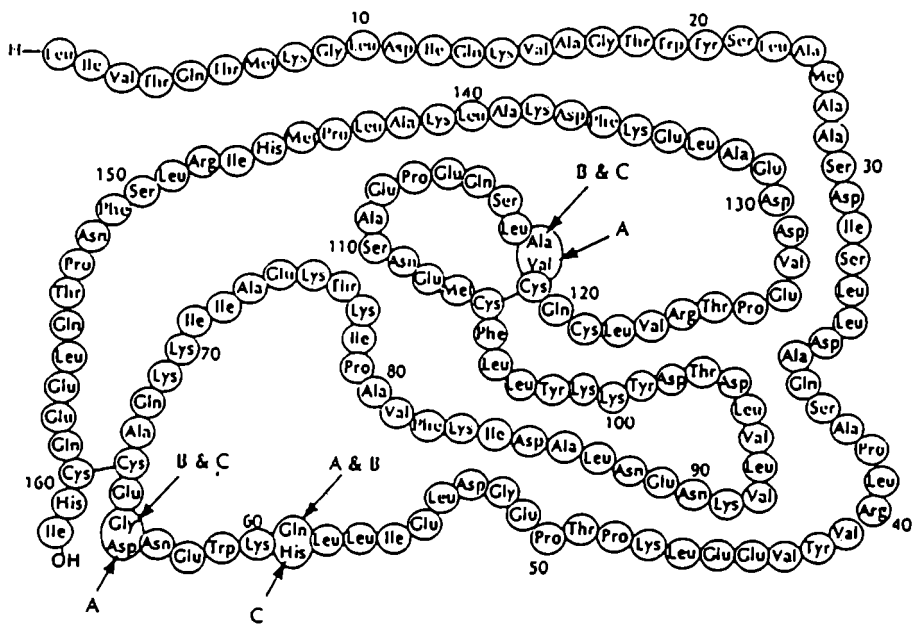


FIGURA N° 7 Estructura de la β -lactoglobulina. A, B y C son variantes genéticas.



CUADRO N° 3. Resistencia térmica de enzimas microbianas.

CUADRO N° 3- SOME PROPERTIES OF BACTERIAL PROTEINASE ACTIVITIES

Organism	pH	Temp. °C	optimum heat resistance			References
			Temp. °C	Time min.	Residual activity (%)	
<i>Ps. fluorescens</i>	-	-	121	9	90	Mayerhofer et al. (1973)
<i>Psychrotrophs</i>	7.8	45	149	0.07	90	Adams et al. (1975)
<i>Pseudomonas</i> MC 60	7.8	45	150	1.5	10	Adams et al. (1975)
<i>Ps. fluorescens</i>	-	-	40-47.5	30	0	Kielwein (1975)
<i>Psychrotrophs</i>	-	-	130	8.8	10	Kishonti (1975)
<i>Pseudomonas</i>	-	-	149	0.12	50	Barach et al. (1976)
<i>Ps. fluorescens</i>	7.0	50	130	10	10	Driessen (1976)
<i>Ps. fluorescens</i>	7.0	45	100	10	44	Malik & Swanson (1976)
<i>Ps. fluorescens</i> AR11	6.5	35	140	0.28	50	Alichanidis & Andrews (1977)
<i>Pseudomonas</i>	7.5	45	149	0.6	0	Barach (1978)
<i>Pseudomonas</i> B12	7.0	-	149	0.5	27	Richardson & Te Whaiti (1978)
<i>Pseudomonas</i> B52	6-10	-	149	0.5	60	Richardson & Te Whaiti (1978)
<i>Aeromonas</i>	7.5	-	149	0.5	54	Richardson & Te Whaiti (1978)
<i>Pseudomonas</i> P12	-	-	130	0.3	100	Te Whaiti & Fryer (1978) (96)
<i>Pseudomonas</i> P32	-	-	130	0.3	50	Te Whaiti & Fryer (1978) (96)
<i>Ps. fluorescens</i>	7.0	42-44	45	10	18	Millière & Veillet-Poncet (1979)
<i>Cytophaga</i>	7.0	42-44	45	10	89	Millière & Veillet-Poncet (1979)
<i>Pseudomonas</i>	6.5-6.8	40	121	2	60	Gebre-Egziabher et al. (1980)
<i>Ps. fluorescens</i> B52	7.0	45-50	150	1.6	50	Richardson (1981)
<i>Ps. fluorescens</i> AFT36	6.5	45				Stepaniak et al. (1982)

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro N° 4 se presentan los resultados de las muestras analizadas para los parámetros pH, recuento de células somáticas (RCS/ml), bacterias mesófilas viables totales (BMVT/ml) y recuento de psicrótrofas (PSIC/ml).

Los resultados obtenidos por el método de TNBS no presentaron valores de repetibilidad adecuados por lo que no fue posible su análisis y discusión.

Perfiles nitrogenados de leches crudas:

La Figura N° 8 muestra los perfiles electroforéticos obtenidos a partir de electroforesis horizontales y verticales de 12 muestras de leche cruda (23 a 34), elegidas como muestras representativas del resto. En los geles se determinó el origen de las bandas (tipo de caseína) por comparación de su movilidad con la de fracciones de caseínas nativas purificadas, según bibliografía, determinadas en las mismas condiciones (Muset, G. y col., 1984; Collin J.C. y col, 1987; Collin, J.C. y col, 1991; Addeo, F. y col, 1995).

Las muestras analizadas abarcan un amplio rango de recuento de células somáticas que va desde valores muy bajos, de 47.000 cs/ml, (se

consideran fisiológicamente normales valores menores de 250.000 cs/ml) hasta muy altos como 1.722.000 cs/ml.

En los perfiles del gel horizontal pueden observarse claramente las bandas correspondientes a las α S1-CN, β -CN y κ -CN que aparentan tener la misma intensidad en todas ellas excepto en la muestra 32 en la cual es bastante menor. Esto podría deberse a una mayor dilución de la muestra.

Se aprecian pequeñas diferencias en las γ -CN, productos de hidrólisis de la β -CN por acción de la plasmina y de proteasas microbianas, con menor intensidad de aparición en las muestras 23, 24, 25 y 34, siendo éstas de menor contenido de células somáticas, lo cual podría asociarse a la menor actividad de plasmina y/o de proteasas microbianas.

Se observan en todos los perfiles, excepto en la muestra 23, dos bandas entre la α S1-CN y β -CN, que podrían corresponder al activador del plasminógeno asociado a las caseínas (activador-t)(White y col., 1995).

También es de destacar que a pesar del pH anormal medido en la muestra 31 (5.7), el perfil no muestra diferencias con respecto a las otras muestras. Esto evidencia una perturbación del equilibrio iónico pero que no afectaría las proteínas.

En los perfiles de los geles verticales puede observarse desde la siembra hacia el ánodo, en orden de aparición, las bandas correspondientes a las

γ -CN (γ 2-, γ 1- y γ 3-), κ -CN que se ve junto a la γ 3-CN, β -CN, α S-CN y finalmente los productos de proteólisis de este último grupo. Se observan diferencias en la intensidad de bandas de los productos de hidrólisis de las α S-CN, siendo menor en las 3 primeras muestras, correspondientes a bajos niveles de CS/ml, lo cual podría coincidir otra vez con menor actividad de plasmina y proteasas microbianas. Respecto a las γ -CN, productos de acción de la plasmina sobre la β -CN, no fue posible detectar diferencias en intensidad, contrariamente a lo esperado ya que la β -CN se cita como la más susceptible a la misma.

Si bien este trabajo se basa en evaluaciones cualitativas de los perfiles, y no se cuantificaron las fracciones, las tendencias observadas coinciden con las de Ballou y col. (1995), quienes encontraron diferencias significativas en % de caseína y número de caseína (caseína como % de la proteína total) entre muestras con distintos RCS siendo mayores los valores correspondientes a las muestras de leche cruda con menor RCS (menos de 10^5 CS/ml), aunque en este caso los resultados podrían deberse a la menor síntesis de caseína como consecuencia del daño en la glándula mamaria o mastitis. Los mismos autores reportan valores de actividad de plasmina significativamente mayores en el grupo de mayor RCS ($> 4 \times 10^5$). De igual forma, Gilmore y col (1995) encontraron mayor

actividad del activador del plasminógeno asociado con la fracción de caseína en leche con alto RCS/ml ($> a 7.5 \times 10^5$) y Zachos y col (1992) midieron altos niveles de actividad del activador del plasminógeno en células somáticas en leche con RCS/ml mayor a 10^6

Si bien las leches crudas muestran un perfil característico, como puede verse en todas las muestras analizadas, las diferencias observadas en un amplio rango de RCS/ml no parecen ser de gran magnitud determinadas por este único método. Es sabido que los niveles de plasmina varían con el estado de lactancia, y su actividad depende de la interacción entre el plasminógeno inactivo, sus activadores y un complejo sistema de inhibidores de la plasmina y de los activadores del plasminógeno (Bastian y Brown, 1996). Es importante también tener en cuenta el tiempo disponible por las enzimas, ya que estos ensayos se realizaron dentro de las 24 hs postordeño.

La fracción denominada NS analizada mediante HPLC representa las proteínas solubles normales de la leche, e incluye también los productos de hidrólisis, proteosa-peptona, CMP y péptidos solubles a pH 4.6.

Con respecto a los perfiles cromatográficos del nitrógeno soluble de las muestras, se realizó el análisis de los resultados agrupando las mismas

como de bajo y alto RCS/ml (se utilizó como criterio el nivel fijado por la UE, de 400.000 cs/ml, para leche cruda destinada a tratamiento térmico y comercialización entre los países miembros).

Dentro del grupo de bajo recuento y tomando este grupo para la descripción del perfil "normal" de leche cruda de la zona de muestreo mencionada, pueden distinguirse 10 zonas características. La magnitud de los picos correspondientes a las zonas 3 y 9 permite distinguir dos tipos de perfiles dentro de este grupo (Gráfico N°12): uno pertenece a las muestras 23 y 24 y el otro a las muestras 7, 25, 34, 37, 38 y 39.

Se presentan en el Anexo los perfiles correspondientes a las muestras 8, 11, 12, 13 y 14, cuyo perfil se asemeja a los de éste grupo.

El Gráfico N°13 compara los perfiles de leche cruda con distinto RCS/ml.

En el grupo de alto RCS/ml, la similitud de perfiles permite hacer una subdivisión entre las muestras 5, 6, 26, 27, 28, 29, 40 y 41 por un lado (de los cuales se muestra uno representativo), en el rango de las 500.000-600.000 cs/ml, con aparición de los mismos picos que en las muestras de bajo recuento, pero con pequeñas diferencias en la zona de picos denominada 10, y las muestras 30, 31, 32 y 33 por otro lado, con recuentos del orden del millón de cs/ml, donde se aprecian las mayores diferencias luego de la zona del pico 6, siendo característico de todas ellas

la aparición de un grupo de picos entre 20 y 30 min. lo cual concuerda con el perfil del CMP (Gráfico N°14), por lo que podría pensarse en una hidrólisis incipiente de la κ -CN en este grupo de muestras por un estado higiénico-sanitario deficiente.

Es decir que el análisis de esta fracción (NS) muestra diferencias en los perfiles según el RCS/ml, básicamente, aparición de algunos compuestos entre los 20 a 30 min., siendo más evidentes con RCS/ml de alrededor de 1 millón y mayores.

Con respecto al nitrógeno no proteico pueden distinguirse 9 picos característicos (Gráfico N° 15), los cuales pueden apreciarse en todas las muestras, a partir de los 10 min. de elución; sin embargo la zona de picos anterior a la elución del TCA (1) permite distinguir dos tipos de perfiles para ésta fracción. El Gráfico N° 16 permite observar que los perfiles del NNP de leches crudas con distinto RCS/ml, no muestran diferencias.

El Gráfico N° 17 muestra los perfiles comparados de NS de una muestra de leche UAT entera analizada dentro del período de vida útil (I) y la misma muestra con agregado de quimosina (II). Se observa aparición de nuevos picos entre los 20 y los 30 min., característicos del CMP.

En el Gráfico N° 18 se presentan los perfiles de NNP de de las mismas muestras, detectándose, nuevamente, diferencias entre los 20 y 30 min.

Estos resultados demuestran que el CMP, en determinada concentración, puede ser detectado también en la fracción NNP. Puede inferirse que en éste trabajo no se evidenció en las muestras de alto RCS/ml, probablemente debido a su baja concentración, disminuída a su vez por la adición del TCA para efectuar la precipitación y el efecto de dilución producido.

Le Roux y col (1995a), si bien encontraron correlaciones significativas entre RCS/ml y variables relacionadas a proteolisis como actividad de plasmina ($r=0.67$), relación caseína/nitrógeno total ($r= -0.65$), índice de proteolisis ($\% \gamma\text{-CN} / \% \alpha\text{-CN}+\beta\text{-CN}+\kappa\text{-CN}$) ($r= 0.64$) y contenido de fracción proteosa-peptona ($r= 0.64$), las mismas no fueron lo suficientemente fuertes como para determinar que el RCS/ml sea una medida confiable de la extensión del deterioro de las proteínas de la leche. En este trabajo, el perfil de NS evidenció diferencias cuando se trató de muestras con altos RCS/ml, bajo el supuesto de que el alto RCS/ml estuvo asociado con altos valores de ufc/ml y por ello de proteasas microbianas responsables de la hidrólisis de la $\kappa\text{-CN}$, originando sus productos de hidrólisis.

Perfiles nitrogenados de leches con tratamiento térmico:

Las Figuras N° 9 y 10 muestran los perfiles electroforéticos de muestras de leche cruda, leche con distintos tratamientos térmicos (pasteurización, ultrapasteurización, UAT y deshidratada) y un queso untable, producto que ha sufrido proteólisis para su elaboración (muestras 1 a 22).

En todas se observa claramente la presencia de las bandas correspondientes a las β -CN y α S1-CN, aparentemente de igual intensidad salvo para el caso del queso, donde se aprecia la β -CN con menor magnitud y con una banda de mayor movilidad inmediatamente al lado. En esta muestra también se aprecia claramente la presencia de para- κ -CN, producto de hidrólisis de la κ -CN por acción del coagulante (pepsina bovina).

Se observa claramente en las leches crudas la presencia de la κ -CN.

Las leches crudas mostraron un perfil semejante a los descritos para las muestras 23 a 34.

Las leches con tratamiento térmico intenso presentan con mayor o menor intensidad dos bandas con movilidad electroforética intermedia entre la β -CN y α S1-CN, más cercana a la primera, que según Snoeren y Both

(1981) podría ser la β -lactoglobulina, la cual, debido a desnaturalización por el calor, puede coprecipitar con las caseínas. El tratamiento de UAT desnaturaliza casi completamente la β -lactoglobulina hallándose valores menores a 0.01 gr/litro de leche.

No se observan diferencias de intensidad en los productos de proteólisis como γ -CN, en muestras de leche con tratamiento térmico. Tampoco se observan diferencias entre leches descremadas y enteras, ni entre leches con tratamiento de UAT directo (uperizadas) o indirecto.

Si bien podría esperarse mayor presencia de productos de hidrólisis en leches de larga vida, una de las posibles explicaciones de que ello no ocurra podría ser un efecto inhibitorio de la β -lactoglobulina desnaturalizada sobre la actividad de la plasmina por formación de uniones tiol-SH, efecto que se evidencia con una menor actividad proteolítica de la plasmina cuanto más intenso es el tratamiento térmico (Snoeren, T. y col, 1979; Humbert and Alais, 1979, Grufferty and Fox, 1988, citados por Knutson y col, 1993; Kennedy y Kelly, 1997). Kelly y Foley (1997) demostraron la influencia de la formación de este complejo plasmina- β -lactoglobulina sobre la proteólisis en leche UHT mediante el uso de un agente oxidante, KIO_3 . También se ha reportado que la

desnaturalización de la β -lactoglobulina resulta en la inactivación del plasminógeno (Kennedy y Kelly, 1997).

La estabilidad al calor de la actividad de la plasmina bovina en leche tratada térmicamente parece estar relacionada con el RCS de la leche de origen, es decir que la leche mastítica sometida a tratamiento térmico contendrá mayor cantidad de plasmina menos activa, probablemente debido a que posee mayores niveles de proteínas con grupos tiol, como la seroalbumina (Kennedy y Kelly, 1997), que producen igual interferencia que la β -lactoglobulina.

Con respecto a la actividad de las proteasas microbianas, no se detectó su actividad en estas electroforesis excepto por la para- κ -CN, que se evidenció en el queso debido a la acción de la quimosina o pepsina incorporada en el proceso de elaboración. Dado que no se conoce la calidad higiénica inicial de estas leche no puede hacerse ninguna inferencia, solo podemos afirmar que en las condiciones en que se efectuó el análisis no se detectaron productos de hidrolisis de las proteasas microbianas por esta técnica.

En las electroforesis verticales solo se aprecian diferencias en la muestra correspondiente al queso, con menor intensidad de las bandas correspondientes a las β -CN y α S1-CN.

Respecto a los cromatogramas del NS (Gráfico N° 19) se comparó el perfil característico de leche cruda de bajo RCS/ml analizado previamente (Gráfico N°13) con el de leche tratada térmicamente con distinta intensidad (ultrapasteurizada, UAT). Los perfiles de éstas últimas se diferencian de la leche cruda en la zona de compuestos polares que eluyen al comienzo de la cromatografía, y luego de la zona 10 (compuestos no polares de mayor peso molecular).

En el caso del NNP (Gráfico N° 20) las diferencias se observan principalmente en la zona 9, siendo de mayor magnitud en las muestras con tratamiento térmico respecto a las crudas y en la zona anterior a la elución del TCA. Se repite lo observado para el NS, es decir las diferencias se evidencian entre leche cruda y leche tratada térmicamente, no observándose diferencias debidas a la intensidad del mismo.

De igual forma que la electroforesis, éste método permitió detectar diferencias de perfil con la leche cruda, pero no mostró diferencias en los perfiles según la intensidad del tratamiento térmico.

Perfiles nitrogenados de muestras con inducción de proteolisis:

El Cuadro N° 4 muestra el recuento de psicrótrofos/ml (PSI/ml) y de bacterias mesófilas viables totales/ml (BMVT/ml) de las muestras 35 a 41 obtenidos como consecuencia de 0 a 8 días de almacenamiento en refrigeración.

Según reporta la bibliografía, si el recuento de mesófilos viables totales es alto se espera que la población de psicrótrofos sea un porcentaje importante del mismo, por lo tanto, en el caso de estas muestras inferimos que el recuento inicial fue elevado.

Se observa que las muestras de partida tienen un recuento de bacterias mesófilas viables totales elevado, es decir su calidad higiénica inicial fue deficiente; este recuento así como el de psicrótrofos se mantuvo en el mismo orden exponencial luego de los 2 días de refrigeración y aumentó en 4 ordenes luego de 8 días para las muestras 35 y 36, y en 1 orden luego de 6 días para las muestras 37 a 41. En las condiciones del estudio no pudo determinarse la curva de crecimiento de los microorganismos de modo de establecer la ubicación de las fases correspondientes.

Analizando los perfiles electroforéticos de geles horizontales

(Figuras N° 11 y 12) no se visualizan por este método diferencias entre los días 0 y 2 de refrigeración. En cambio sí se visualiza menor intensidad de

las bandas correspondientes a la β -CN y κ -CN y aparición de los productos de hidrólisis, γ -CN (1, 2 y 3) y para- κ -CN en las muestras con 8 días de refrigeración. La Figura N° 11 puede visualizarse en forma cuantitativa (% de caseína) en la siguiente Tabla, obtenida a partir del densitograma del gel:

	BANDAS					
	1	2	3	4	5	6
para- κ -CN	-	-	-	-	20	10
γ_2 - CN	-	-	-	-	3	5
γ_1 - + κ -	15	8	7	11	7	4
γ_3 - CN	11	8	13	13	10	9
β	23	26	29	28	22	23
α_1	-	-	-	-	2	6
α_2	15	13	17	18	6	13
α_{s1} -CN	36	39	34	31	27	24
α_{s1} -I	-	-	-	-	3	6

No ocurrió lo mismo con las muestras de 6 días de refrigeración, ya que sus perfiles no parecen ser distintos de los correspondientes a las muestras de 0 y 2.

En el caso de los perfiles electroforéticos de geles verticales, se distingue, como era de esperar, un aumento de las γ -CN en las muestras con 8 días de refrigeración. En los perfiles correspondientes a 6 días de refrigeración las bandas parecen estar presentes en las mismas proporciones y no se visualiza aparición de bandas nuevas. Esto concuerda con los resultados

anteriores. Pareciera ser que dentro del rango entre 6 y 8 días se produjo una importante modificación de las proteínas.

El perfil obtenido por éste método fue cualitativamente distinto a los 8 días de refrigeración, cuando la población mencionada estaba en el rango de 10^7 - 10^8 ufc/ml, y no pudieron visualizarse diferencias aún con recuentos tan altos como 10^6 ufc/ml a los 0 y 2 días. Según Grieve y Kitchen (1985) (citado por Picard y col, 1994) los cambios en cuanto a hidrólisis de caseínas se hacen visibles cuando el recuento de psicrótrofos es de 10^6 - 10^7 ufc/ml, que en su experiencia correspondió a la etapa de liberación de enzimas microbianas (fin fase exponencial/comienzo de la fase estacionaria). Ravanis y Lewis (1995) también hallaron que el fin de fase exponencial/ principio de fase estacionaria se produjo con un recuento de psicrótrofos de 10^7 ufc/ml partiendo de 10^4 y se produjo a los 7 días de refrigeración a 4°C.

Guinot-Thomas y col (1995a) obtuvieron una disminución del contenido total de caseínas luego de 4 días de refrigeración, momento en el cual el recuento de psicrótrofos fue de 10^6 - 10^7 ufc/ml y también correspondió a la misma fase de crecimiento. En cambio, Adams y Barach (1976) (citados por Guinot-Thomas y col, 1995b) reportan disminuciones de la κ -CN de entre 10-20% con recuentos menores de psicrótrofos, de 10^5 ufc/ml.

También se reportan diferencias entre cepas en cuanto a la actividad de sus proteasas (Ballou y col, 1995). Picard y col. (1994) inocularon las muestras con distintas cepas de *Pseudomonas fluorescens* y reportaron aumento en el CMP por acción de proteasas microbianas a partir del día 4 de refrigeración a 4°C con un recuento de psicrótrofos de 10^8 ufc/ml, partiendo el día 0 con 10^4 ufc/ml, sin embargo según la cepa analizada, hallaron variaciones en la proporción de κ -CN hidrolizada en el mismo período.

Collins (1993) encontró igual extensión de proteólisis, medida con el método de TNBS, cuando el recuento de psicrótrofos en leche cruda varió desde 7.7×10^4 hasta 8.5×10^6 ufc/ml.

Guinot-Thomas y col (1995b) obtuvieron crecimiento de 2 ordenes exponenciales cuando el recuento inicial de psicrótrofos partió de 2.8×10^4 , pasando a 5.1×10^6 ufc/ml, mientras que cuando se partió de leche con un recuento de psicrótrofos de 4×10^3 ufc/ml, a los dos días de refrigeración se llegó a 9.2×10^3 ufc/ml. En ninguno de los dos casos obtuvieron variaciones en el contenido de fracciones nitrogenadas por lo que se supone que la población microbiana estaba en su fase exponencial de crecimiento y por lo tanto la producción de enzimas fue baja (Shelley y Deeth, 1986; Griffiths, 1989; Rowe, 1990, citados por Guinot-Thomas y col,

1995). En este trabajo la etapa de producción de enzimas se produjo aparentemente con un recuento de psicrótrofos de 10^7 - 10^8 ufc/ml, aunque haría falta un estudio más intensivo para corroborarlo.

Respecto al origen de la hidrólisis, con muestras con y sin agregados de bactericidas y uroquinasa como activador del par plasmina-plasminógeno, Guinot-Thomas y col (1995b) no obtuvieron diferencias en el contenido de caseínas entre 0 y 6 días de refrigeración por lo que concluyen que las proteinasas bacterianas tienen un rol más importante a 4°C que la plasmina. En este trabajo los resultados obtenidos a los 8 días indican que actuaron ambos tipos de enzimas, ya que se observa la banda correspondiente a la para- κ -CN que es producto de acción de las proteinasas bacterianas sobre la κ -CN (ya que esta última es resistente a la acción de la plasmina), pero también se observan productos de acción de la plasmina sobre la β -CN.

Los mismos autores citados en último término también midieron actividad de la plasmina a través de los días de refrigeración y hallaron una disminución de la misma, siendo 1.2 veces mayor, el día 0 que el día 6, y lo atribuyen a una posible autólisis de la enzima que podría ocurrir al pH de la leche (Walsh y Wilcox, 1970, citados por Guinot-Thomas y col (1995b)).

Los Gráficos N°21 y 22 presentan los perfiles de muestras de leche cruda sometidas a 0, 2 y 8 días de refrigeración. Se destaca la gran aparición de picos en las muestras de 8 días de refrigeración desde alrededor de los 10 min hasta el final de la elución, a los 30 min., sin embargo, no se observan diferencias a los 2 días de incubación. Es de hacer notar el mayor deterioro observado en el Gráfico N° 22, que corresponde a una muestra de leche con un recuento de origen de 1.2×10^5 ufc/ml, con respecto a la correspondiente al Gráfico N° 21, que presentó un orden menos en el recuento microbiano.

Picard y col. (1994) encontraron poca variación de los valores de CMP medidos por HPLC entre 0 y 2 días de refrigeración, pero los valores pasaron a ser del doble cuando se determinaron por el método de ELISA, correspondientes a la hidrólisis de menos del 1% de la κ -CN.

Los Gráficos N° 23 y 24 muestran los perfiles del NNP para las leche sometidas a 0, 2 y 8 días de refrigeración y se repite el mismo resultado anterior, o sea, que en los cromatogramas de 8 días se observa un cambio del perfil luego del pico 5, con gran aparición de ellos, y más importante para la leche de 10^5 ufc/ml de partida.

El Gráfico N° 25 muestra los perfiles característicos de NS representativos de 0, 2 y 6 días de refrigeración y el Gráfico N° 26 los correspondientes al

NNP.

Se observa para el día 0 un perfil característico de las muestras 35 a 41 donde se repiten los picos entre los 10 y 25 minutos de elución. El mismo perfil se repite a los 2 y 6 días de refrigeración.

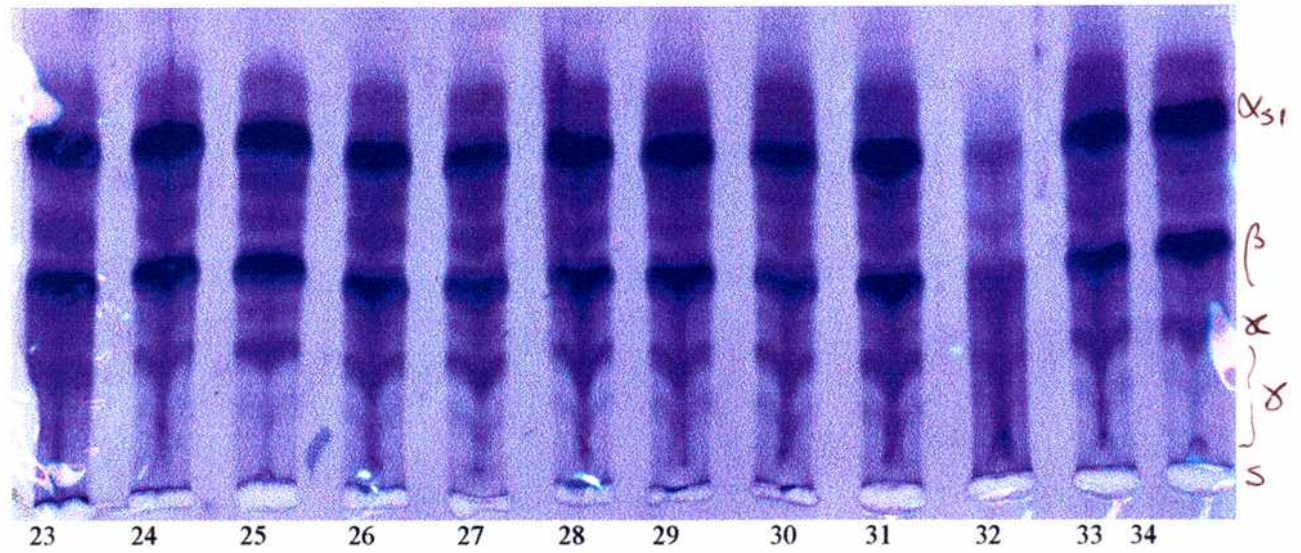
Se observa que, a pesar de partir de leches crudas con distinto orden de recuentos, como puede verse en la Tabla N° 4, no se evidencian diferencias importantes en los perfiles de hasta 6 días de incubación, aún con valores de 10^7 ufc/ml de psicrótrofos.

Respecto a las leches UAT que sufrieron coagulación en estantería se observa, en el perfil electroforético (Fig. N° 13), aparición de productos de hidrólisis de las caseínas (para- κ -CN y α S1-I). El estudio cromatográfico (Gráficos N°27 y 28) muestra, en la comparación con el perfil de una muestra de leche cruda, tanto para NS como para NNP, un perfil completamente distinto con aparición de gran cantidad de picos nuevos y mayor proporción de los ya existentes en la leche cruda "normal", desde aproximadamente los 5 minutos hasta los 30 min, poniendo en evidencia el gran deterioro de la red proteica.

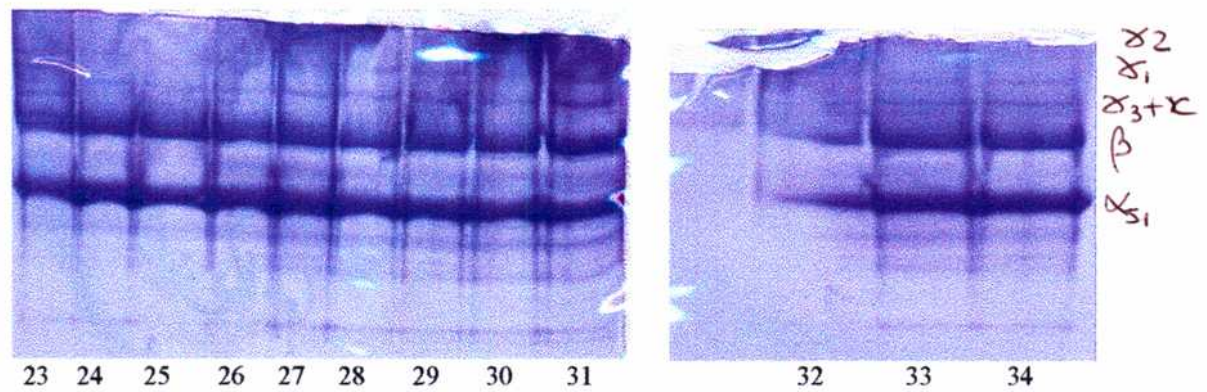
CUADRO N°4. CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS

N°	DESCRIPCIÓN	pH	RCS/ml	BMVT/ml	PSIC./ml
1	UAT entera	6.6			
2	UPERIZADA. descr.	6.6			
3	UPERIZADA. entera	6.7			
4	UPERIZADA. descr.	6.8			
5	Cruda	6.8	439.000		
6	Cruda	6.7	542.000		
7	Cruda	6.8	200.000		
8	Cruda	6.8			
9	UAT N°1- 30 días después de la fecha de vto.	6.5			
10	UL.-PAST. entera orgánica	6.7			
11	Cruda	6.8			
12	Cruda Santa Fé	6.8			
13	Cruda Santa Fé	6.8			
14	Cruda Yersey	6.7			
15	UAT descr.	6.6			
16	PAST. descr.	6.7			
17	UP descr.	6.7			
18	UAT descr.	6.6			
19	EN POLVO				
20	QUESO BLANCO				
21	Cruda	6.8			
22	Cruda	6.8			
23	Cruda	6.8	47.000		
24	Cruda	6.9	137.000		
25	Cruda	6.9	122.000		
26	Cruda	6.8	534.000		
27	Cruda	6.8	615.000		
28	Cruda	6.9	646.000		
29	Cruda	6.9	662.000		
30	Cruda	6.9	1.143.000		
31	Cruda	5.7	1.000.000		
32	Cruda	6.5	1.000.000		
33	Cruda	6.8	1.722.000		
34	Cruda	6.9	78.000		
35	Cruda	6.8	200.000	1.2×10^5	
35-2	Cruda N°35 2 días 4°C	6.9		1.4×10^5	
35-8	Cruda N°35 8 días 4°C			9.0×10^7	
36	Cruda	6.8	127.000	1.7×10^4	
36-2	Cruda N°36 2 días 4°C			2.2×10^4	
36-8	Cruda N°36 8 días 4°C			3.6×10^8	
37	Cruda Santa Fé	6.8	320.000	2.3×10^6	
37-2	Cruda N°37 2 días 4°C			3.2×10^6	1.9×10^6
37-6	Cruda N°37 6 días 4°C			8.0×10^6	2.6×10^6
38	Cruda	6.8	160.000	1.2×10^6	
38-2	Cruda N°38 2 días 4°C			$> 3.0 \times 10^6$	$> 3.0 \times 10^6$
38-6	Cruda N°38 6 días 4°C			2.2×10^7	2.0×10^7
39	Cruda	6.9	150.000	$> 3.0 \times 10^6$	
39-2	Cruda N°39 2 días 4°C			1.5×10^7	$> 3.0 \times 10^6$
39-6	Cruda N°39 6 días 4°C			2.9×10^7	$> 3.0 \times 10^6$
40	Cruda	6.9	550.000	2.0×10^6	
40-2	Cruda N°40 2 días 4°C			9.0×10^6	$> 3.0 \times 10^6$
40-6	Cruda N°40 6 días 4°C			$> 3 \times 10^7$	1.8×10^7
41	Cruda	6.8	600.000	1.1×10^5	
41-2	Cruda N°41 2 días 4°C			2.9×10^6	$> 3.0 \times 10^5$
41-6	Cruda N°41 6 días 4°C			$> 3.0 \times 10^7$	$> 3.0 \times 10^7$
M1	UAT coagulada coágulo				
M2	UAT coagulada sobrenadante				

FIGURA N° 8. ELECTROFORESIS HORIZONTAL DE LECHE CRUDA



ELECTROFORESIS VERTICAL DE LECHE CRUDA



Líneas 23 a 34 indican número de muestra de leches crudas con distinto RCS/ml. **Línea 23:** 47.000 cs/ml. **Línea 24:** 137.000 cs/ml. **Línea 25:** 122.000 cs/ml. **Línea 26:** 534.000 cs/ml. **Línea 27:** 615.000 cs/ml. **Línea 28:** 646.000 cs/ml. **Línea 29:** 662.000 cs/ml. **Línea 30:** 1.143.000 cs/ml. **Línea 31:** 1.000.000 cs/ml. **Línea 32:** 1.000.000 cs/ml. **Línea 33:** 1.722.000 cs/ml. **Línea 34:** 78.000 cs/ml.

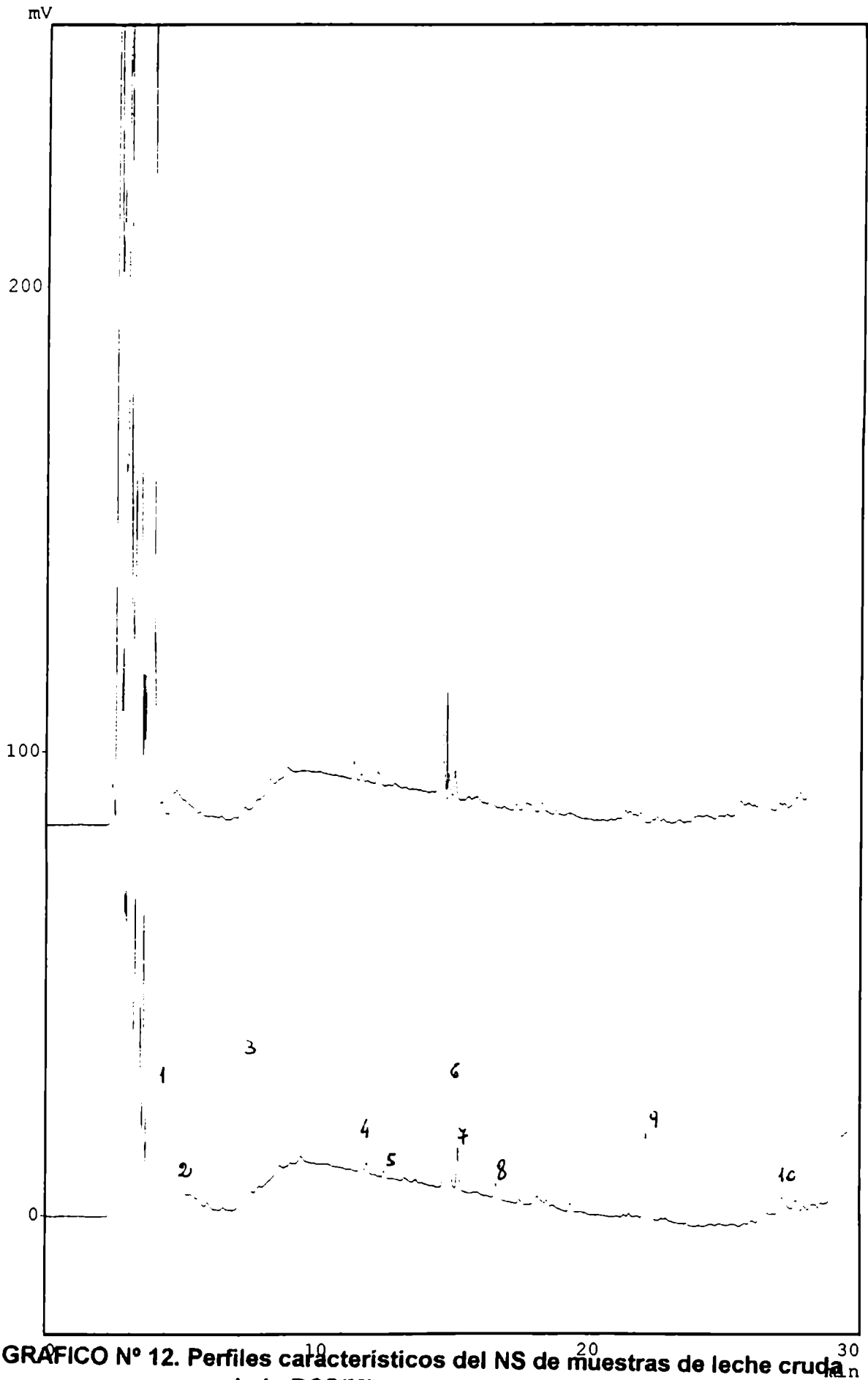


GRÁFICO N° 12. Perfiles característicos del NS de muestras de leche cruda con bajo RCS/ML

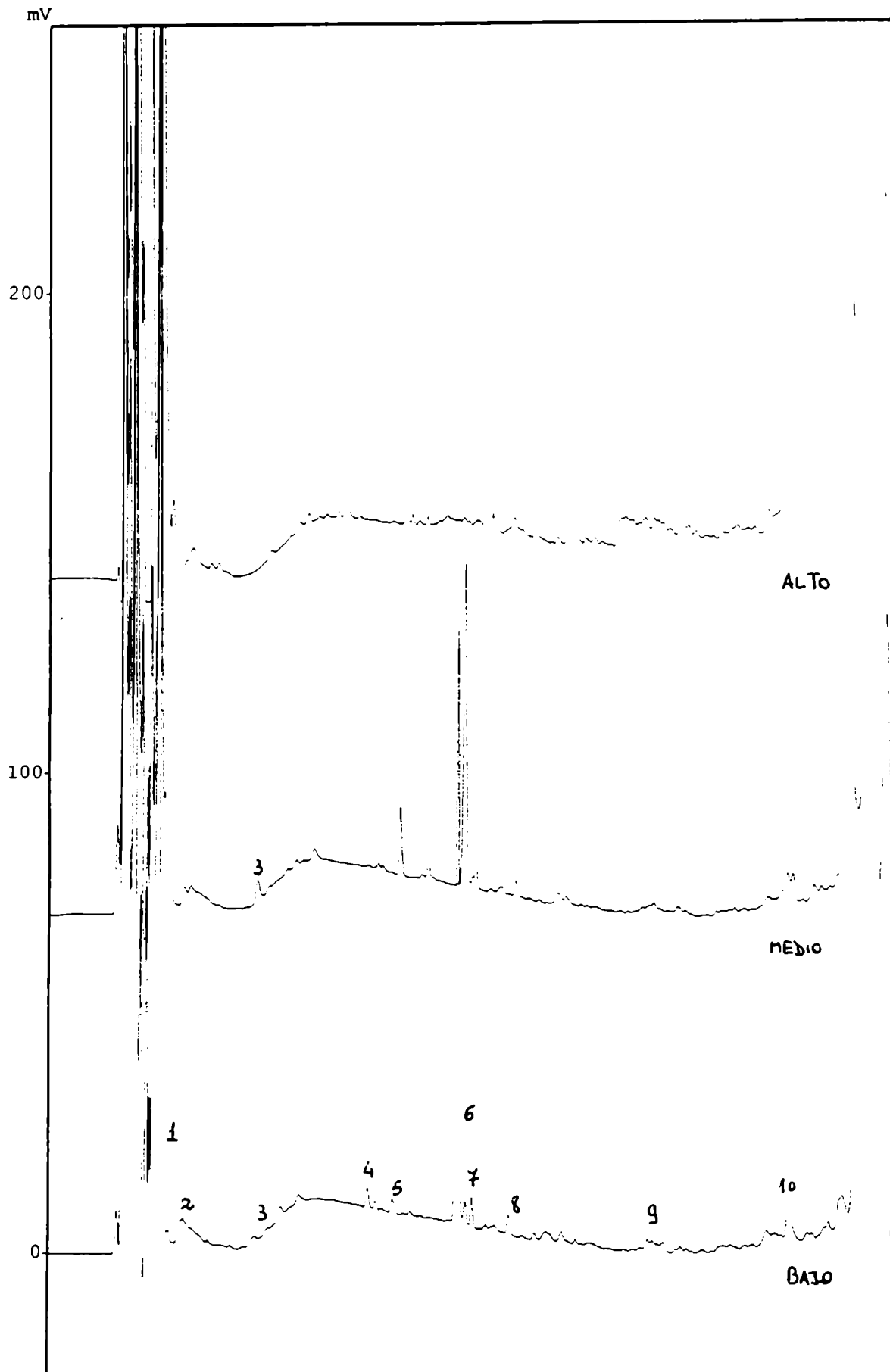


GRAFICO N° 13. Cromatogramas comparados del NS de muestras de leche cruda con distinto RCS/ML

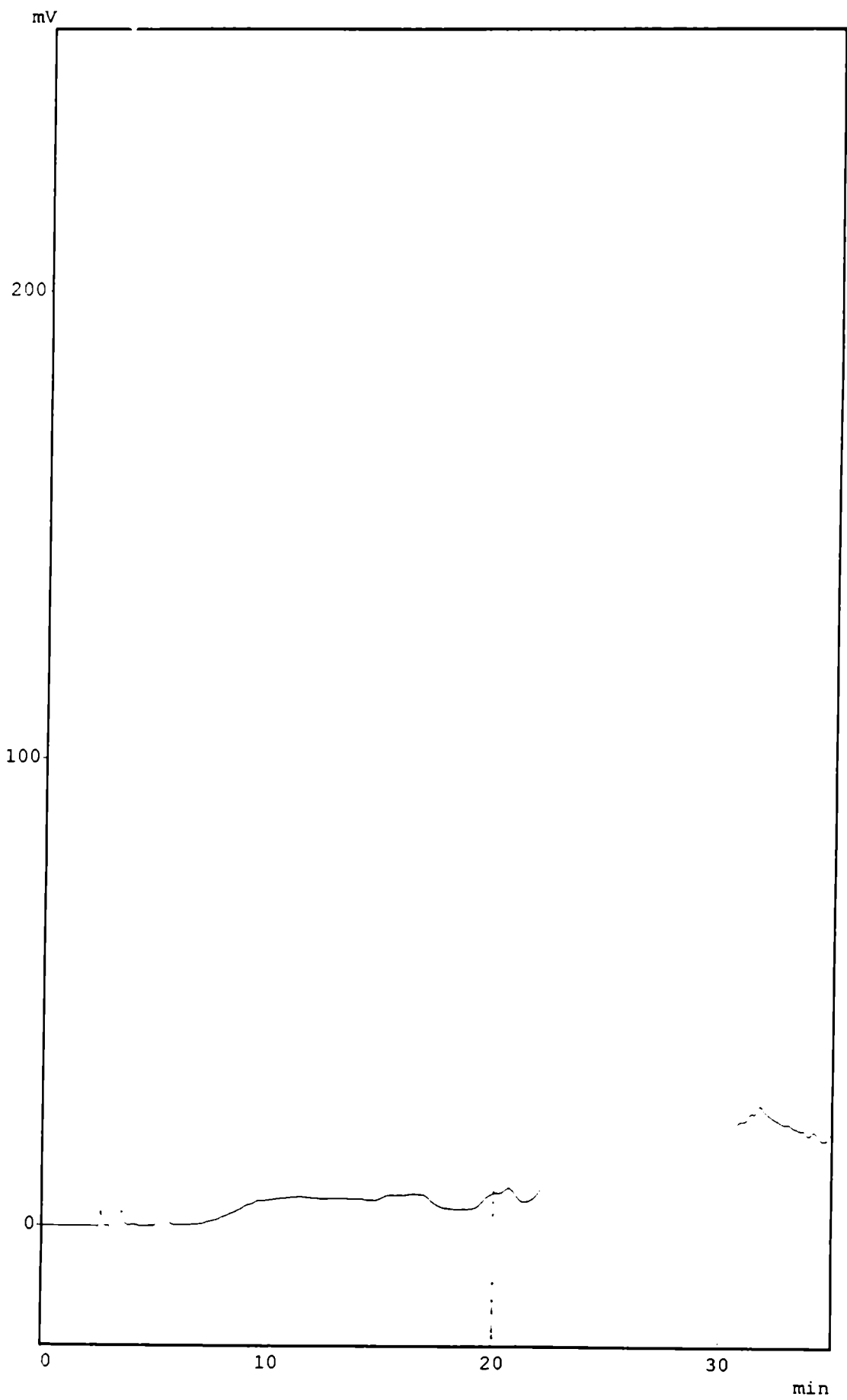


GRAFICO N° 14. Cromatograma del CMP.

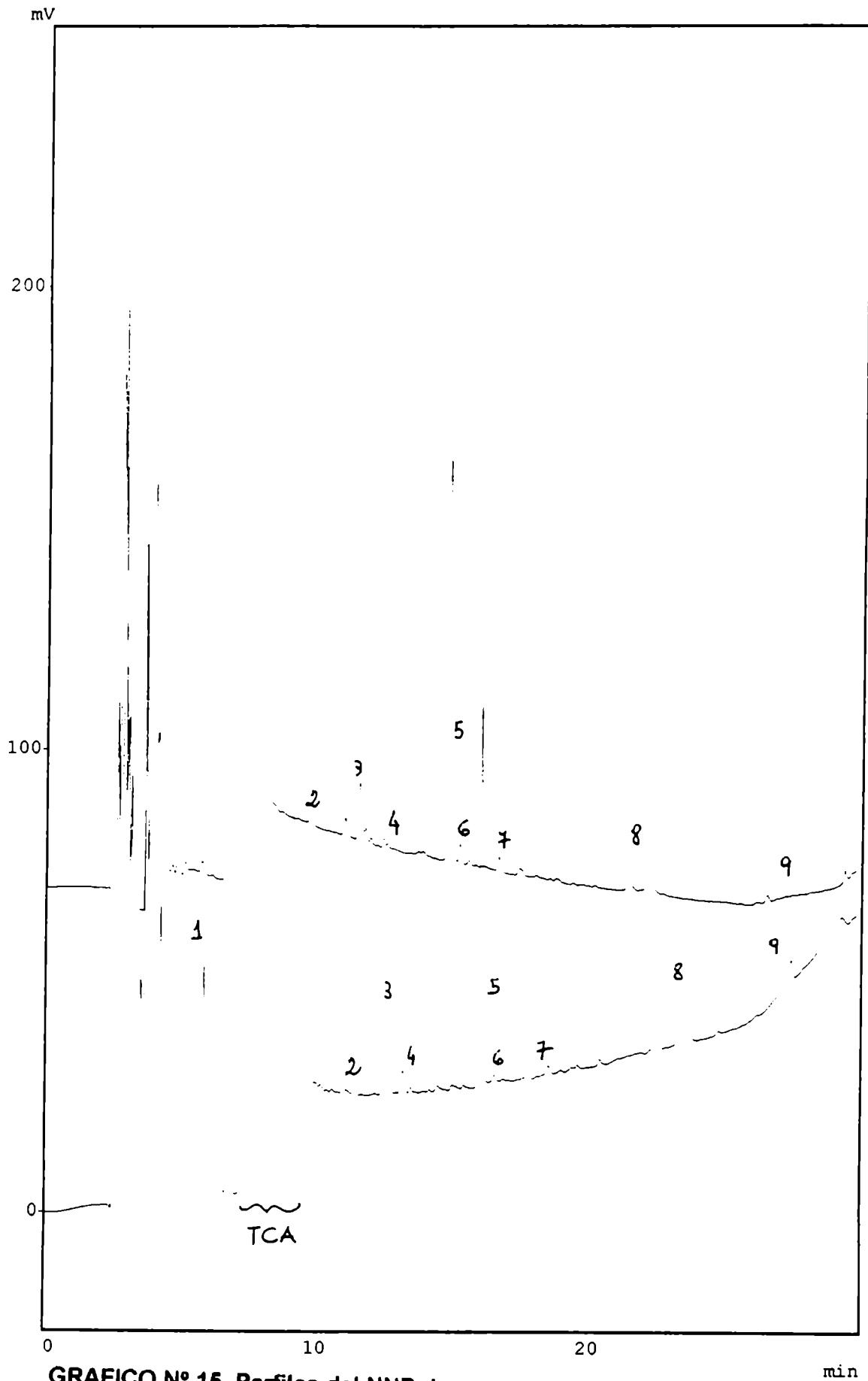


GRAFICO N° 15. Perfiles del NNP de muestras de leche cruda con bajo RCS/ML

min

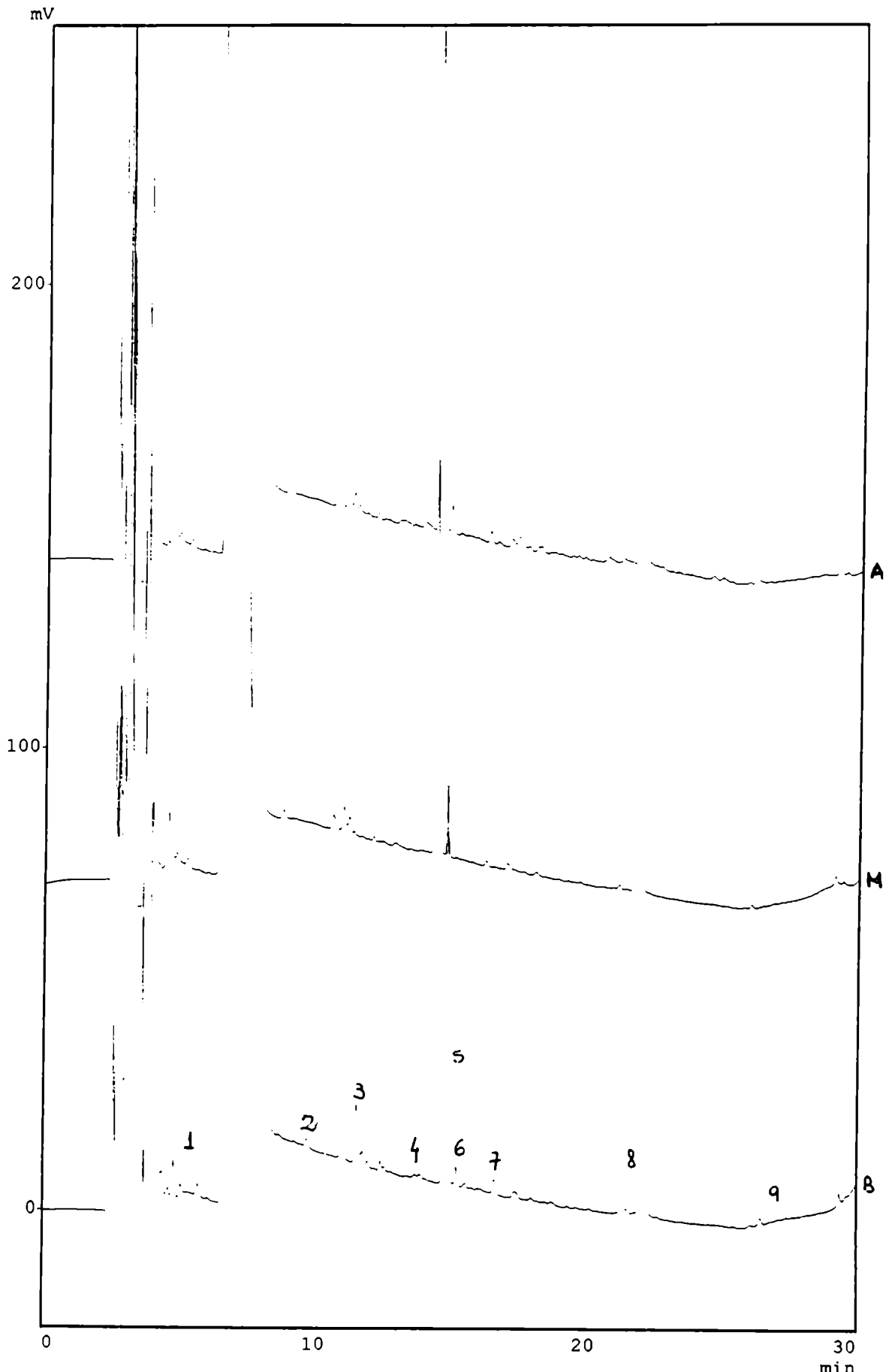


GRAFICO N° 16. Cromatogramas comparados del NNP de muestras de leche cruda con distinto RCS/ML

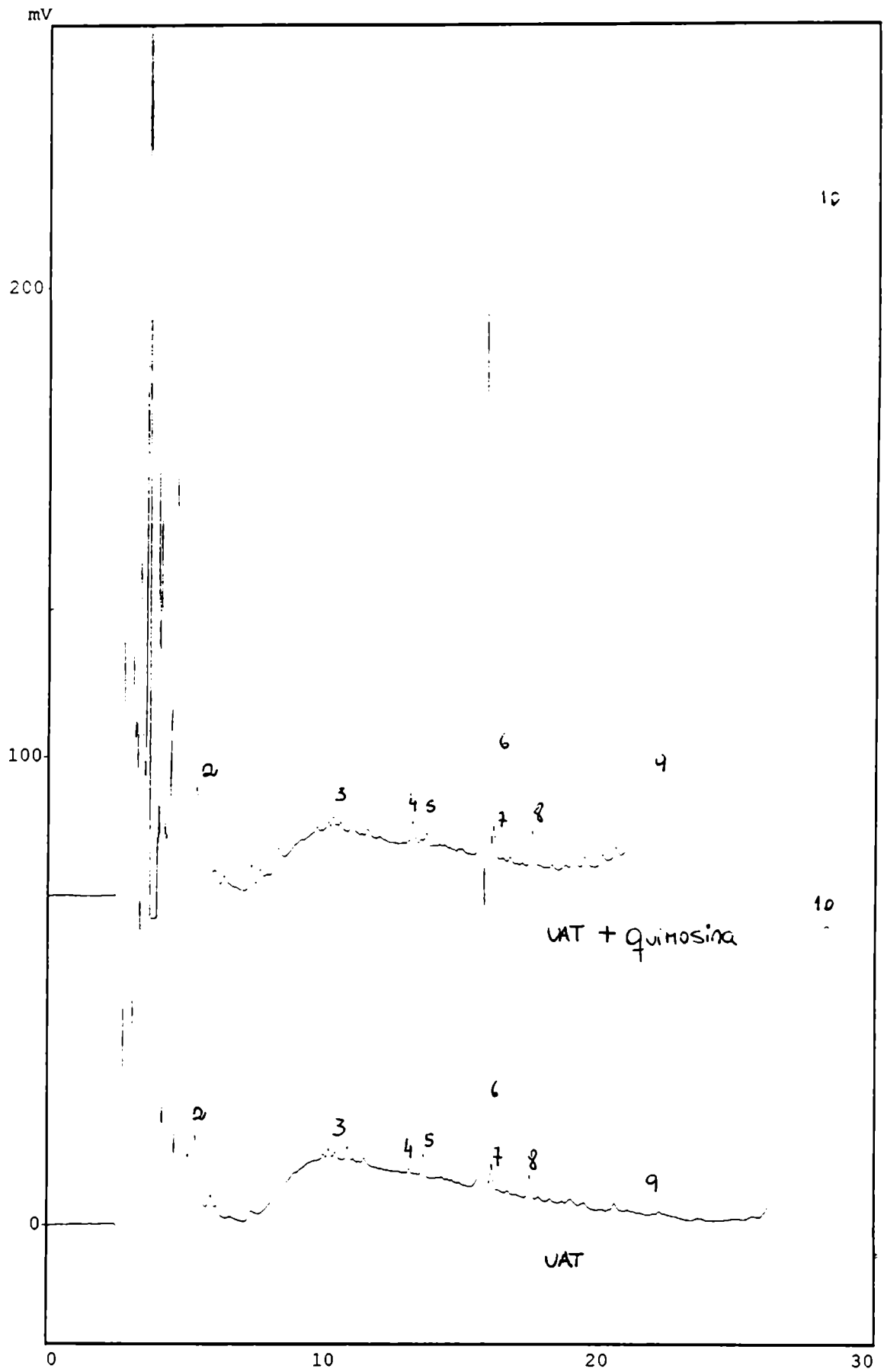


GRAFICO N° 17. Cromatogramas comparados del NS de leche UAT y la misma con agregado de quimosina.

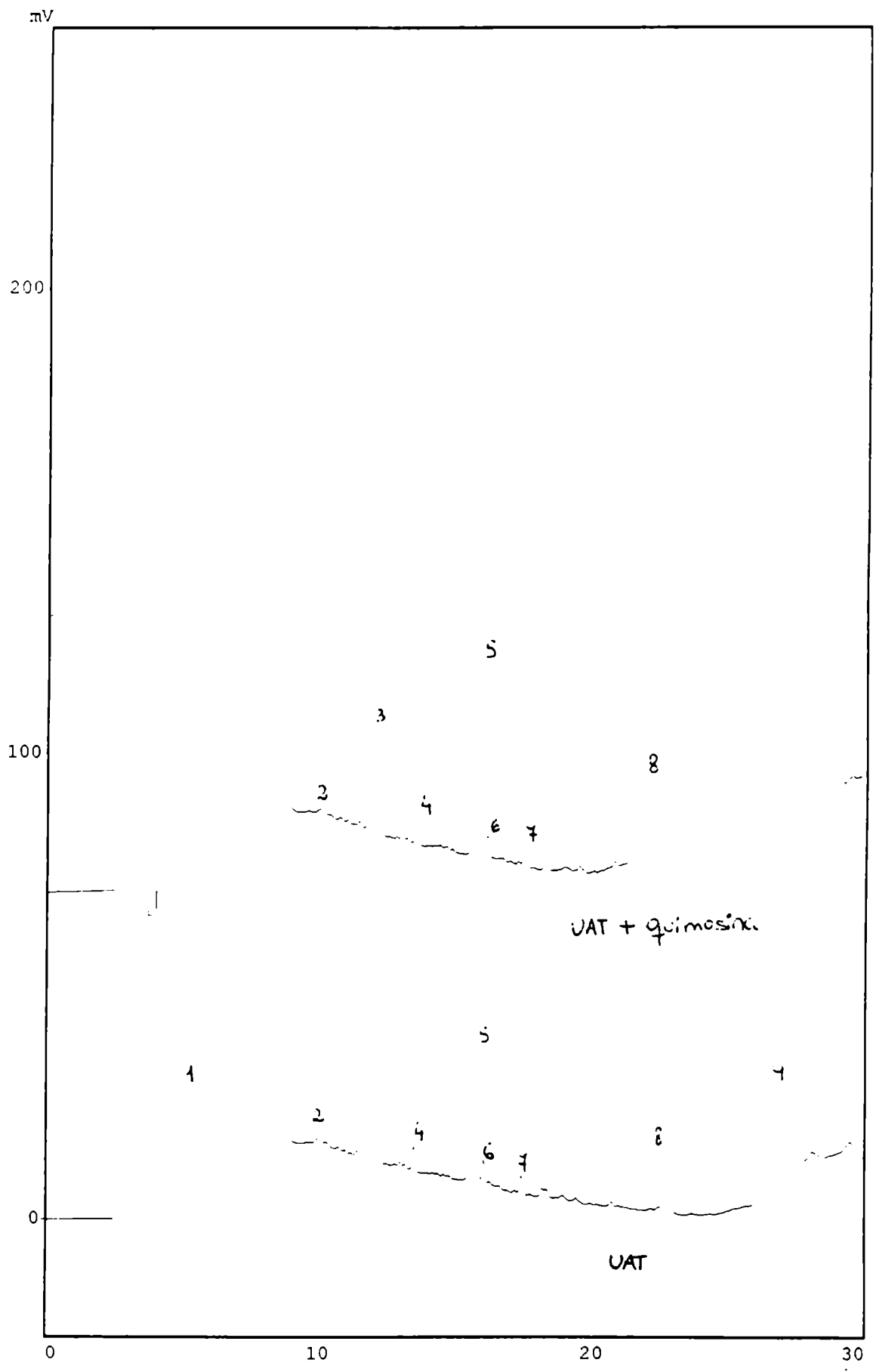
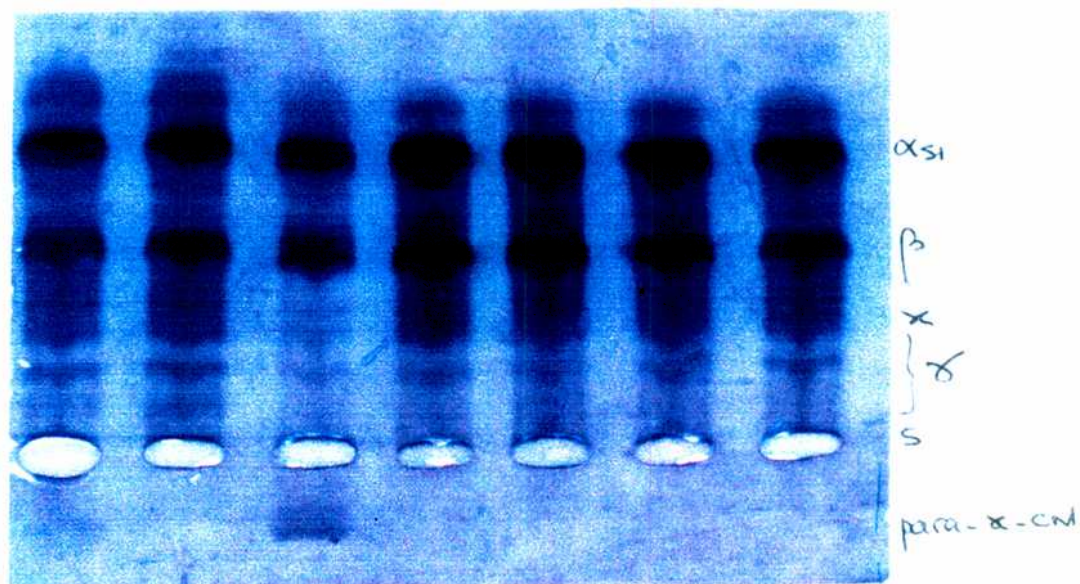
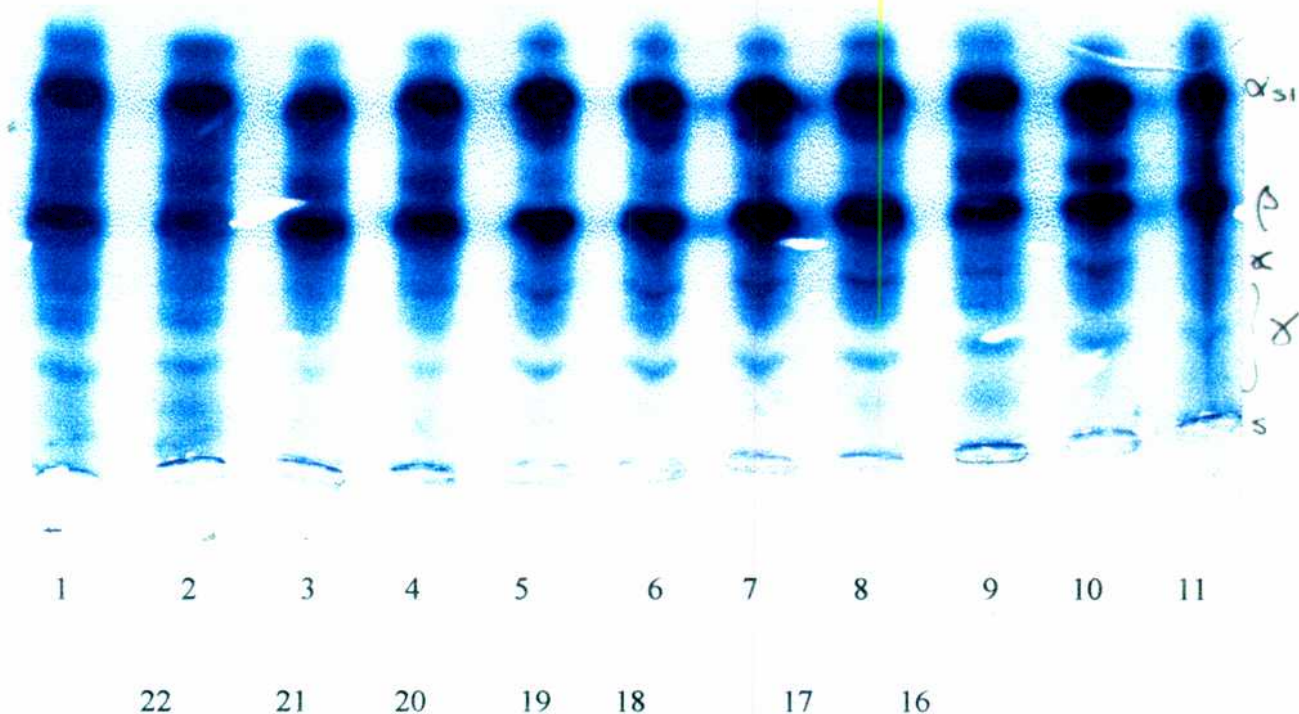


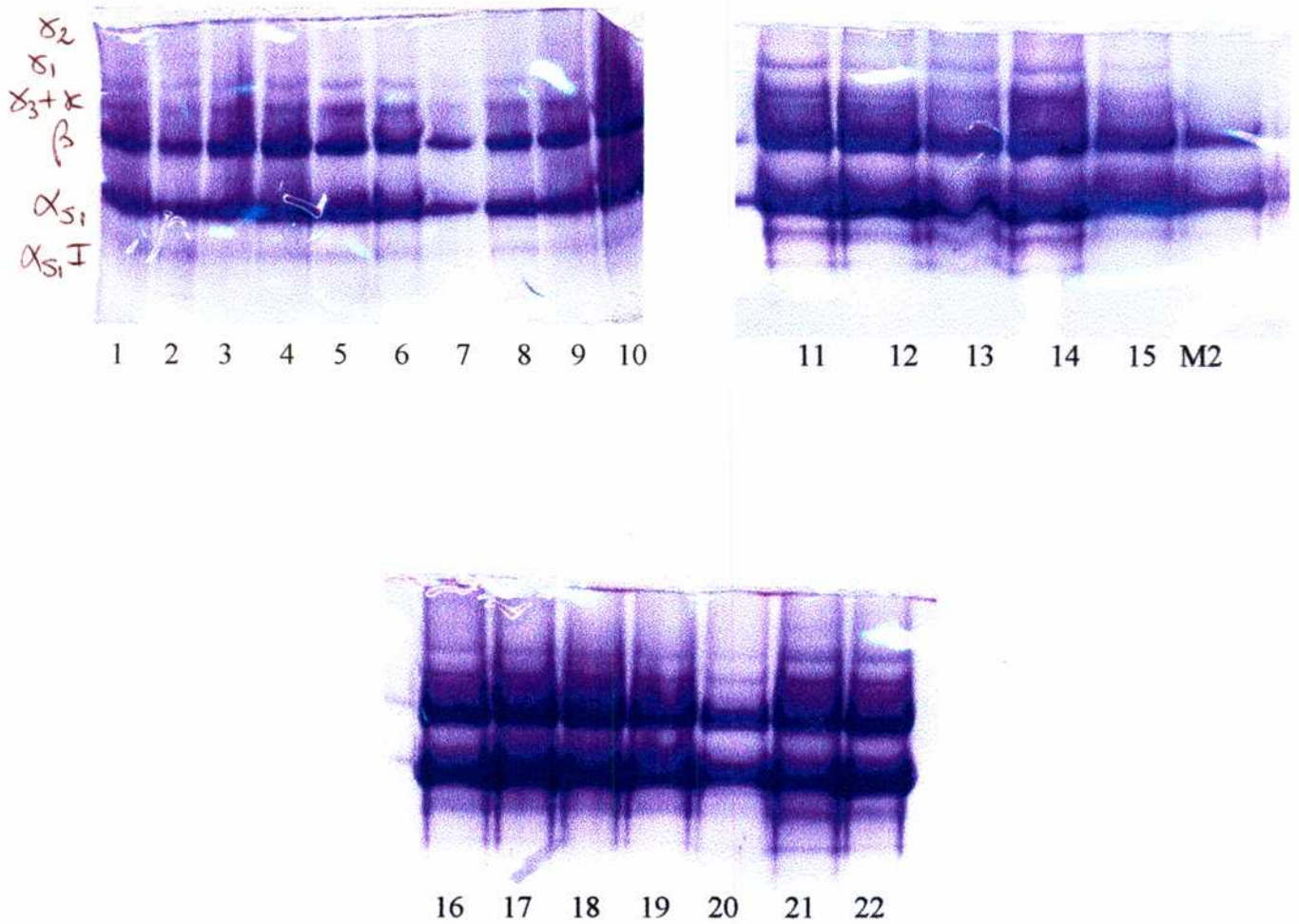
GRAFICO N° 18. Cromatogramas comparados del NNP de leche UAT y la misma con agregó de quimosina.

FIGURA N°9. ELECTROFORESIS HORIZONTAL. MUESTRAS DE LECHE CRUDA, LECHE CON TRATAMIENTO TÉRMICO Y QUESO UNTABLE.



Línea 1: UAT entera. **Línea 2:** UPER. descr. **Línea 3:** UPER. entera. **Línea 4:** UPER. descr.
Línea 5: Cruda 4.4×10^5 cs/ml. **Línea 6:** Cruda 5.4×10^5 cs/ml. **Línea 7:** cruda 2×10^5 cs/ml.
Línea 8: cruda. **Línea 9:** UAT N°1 vencida. **Línea 10:** UL-P entera. **Línea 11:** cruda.
Línea 16: PAST. descr. **Línea 17:** UL-P descr. **Línea 18:** UAT descr.
Línea 19: Leche en polvo. **Línea 20:** queso blanco untable. **Línea 21:** cruda.
Línea 22: cruda.

FIGURA N°10. ELECTROFORESIS VERTICAL. MUESTRAS DE LECHE CRUDA Y LECHE CON TRATAMIENTO TERMICO.



Línea 1: UAT entera. **Línea 2:** UPER. desc. **Línea 3:** UPER. entera. **Línea 4:** UPER. descr. **Línea 5:** Cruda 4.4×10^5 cs/ml. **Línea 6:** Cruda 5.4×10^5 cs/ml. **Línea 7:** cruda 2×10^5 cs/ml. **Línea 8:** cruda. **Línea 9:** UAT N°1 vencida. **Línea 10:** UL-P entera. **Línea 11:** cruda. **Línea 12:** cruda. **Línea 13:** cruda. **Línea 14:** cruda Yersey. **Línea 15:** UAT descr. **Línea M2:** sobrenadante UAT coagulada en estantería. **Línea 16:** PAST. descr. **Línea 17:** UL-P descr. **Línea 18:** UAT descr. **Línea 19:** Leche en polvo. **Línea 20:** queso blanco untable. **Línea 21:** cruda. **Línea 22:** cruda.

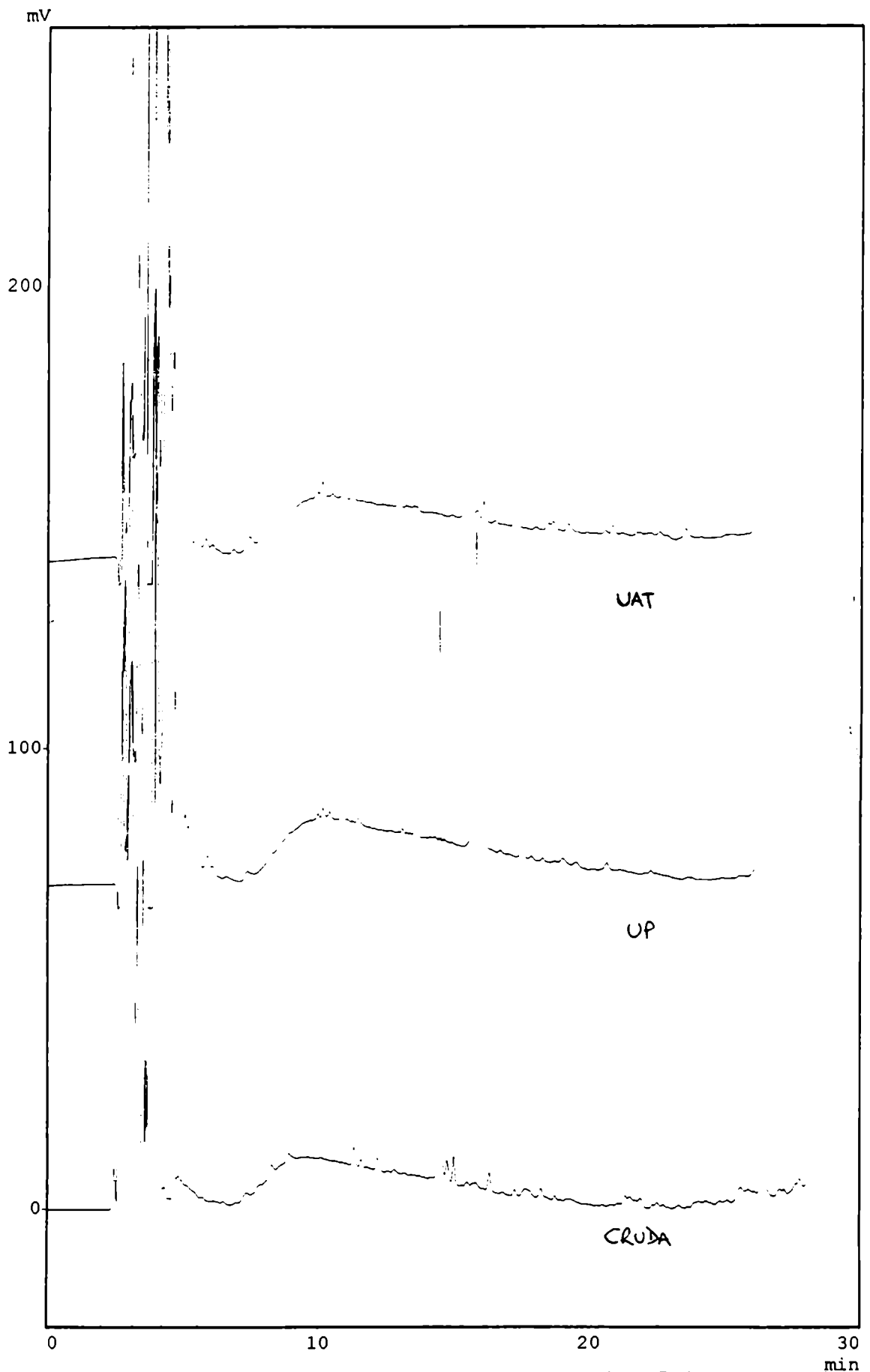


GRAFICO N° 19. Cromatogramas comparados del NS de leche cruda, leche ultrapasteurizada y leche con tratamiento UAT

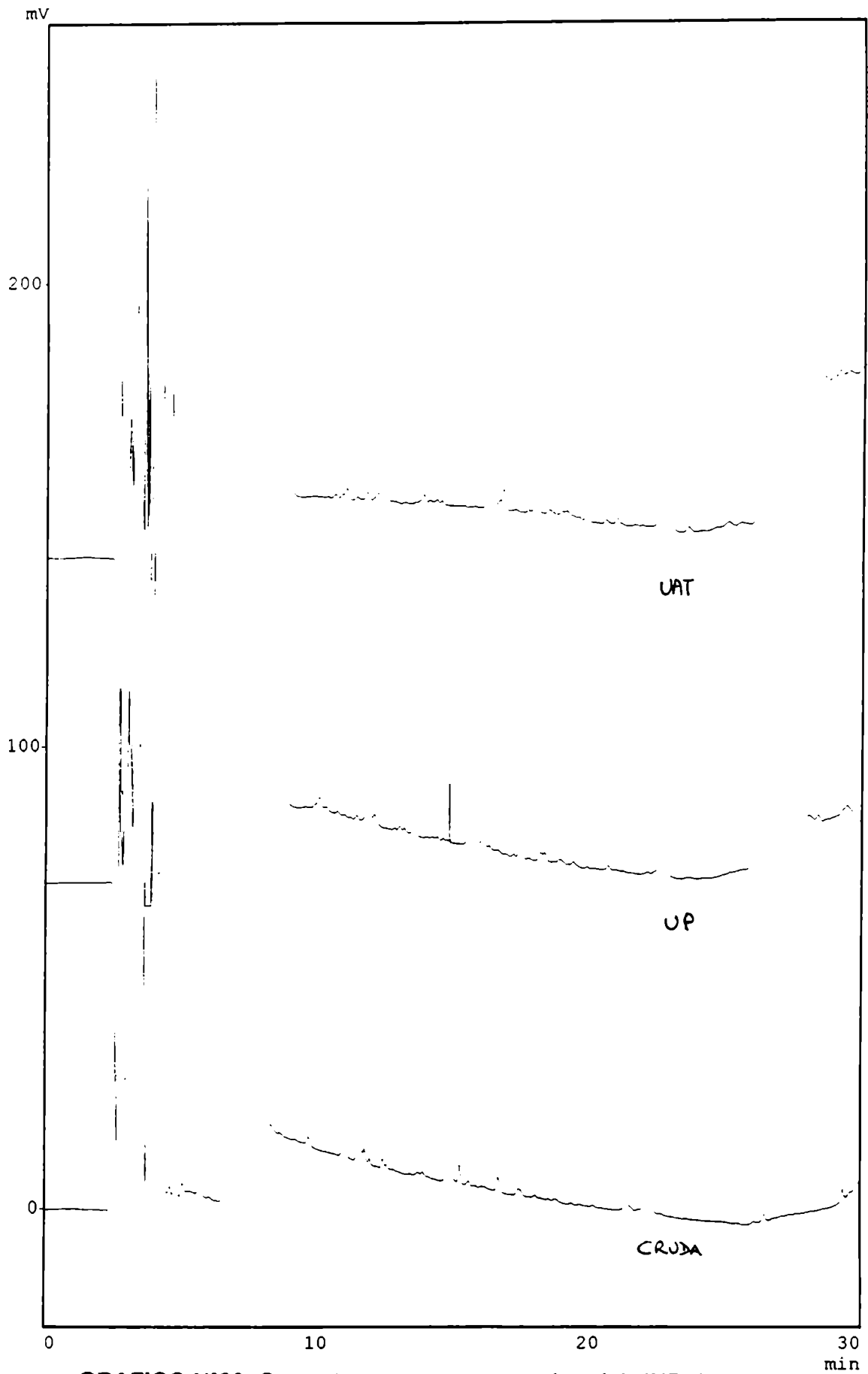
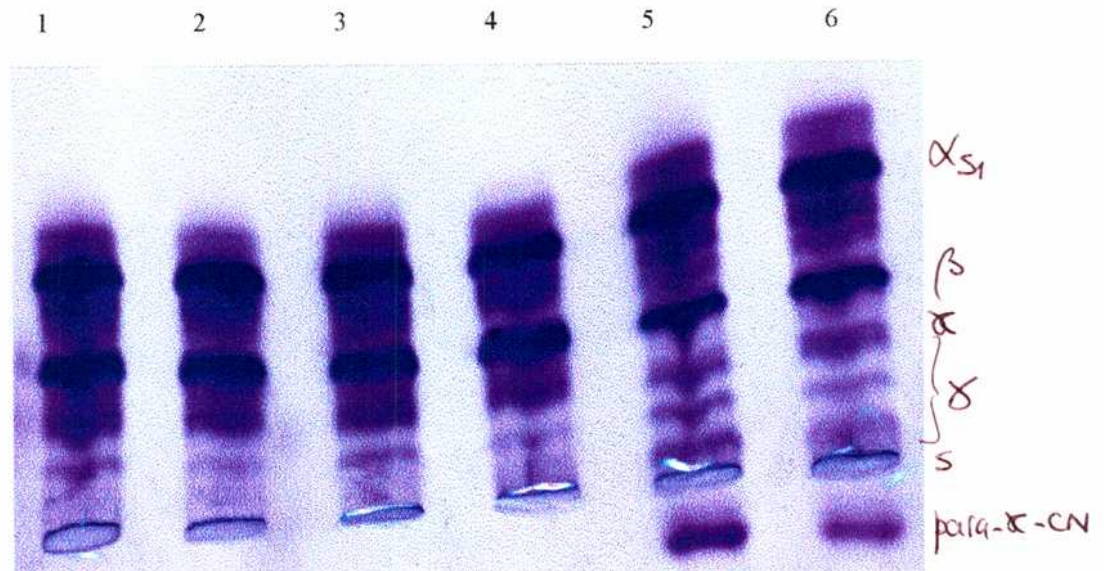


GRAFICO N°20. Cromatogramas comparados del NNP de leche cruda, leche ultrapasteurizada y leche con tratamiento UAT

FIGURA Nº 11. ELECTROFORESIS HORIZONTAL . MUESTRAS DE LECHE CRUDA CON PROTEOLISIS INDUCIDA POR REFRIGERACION.



Línea 1: leche cruda (35) con 200.000 cs/ml. **Línea 2:** leche cruda 36 con 127.000 cs/ml. **Línea 3:** leche cruda 35 sometida a 2 días de refrigeración. **Línea 4:** leche cruda 36 con 2 días de refrigeración. **Línea 5:** leche cruda 35 sometida a 8 días de refrigeración. **Línea 6:** leche cruda 36 sometida a 8 días de refrigeración.

ELECTROFORESIS VERTICAL DE LAS MISMAS MUESTRAS

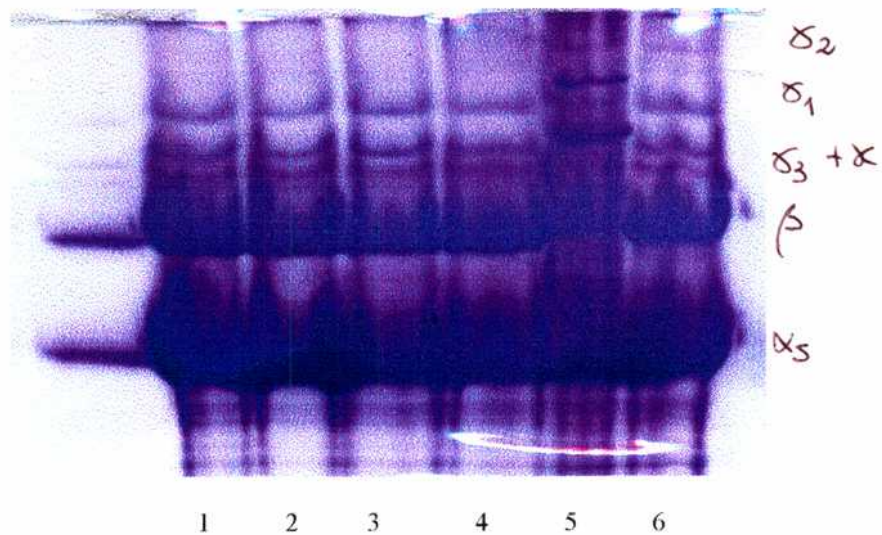
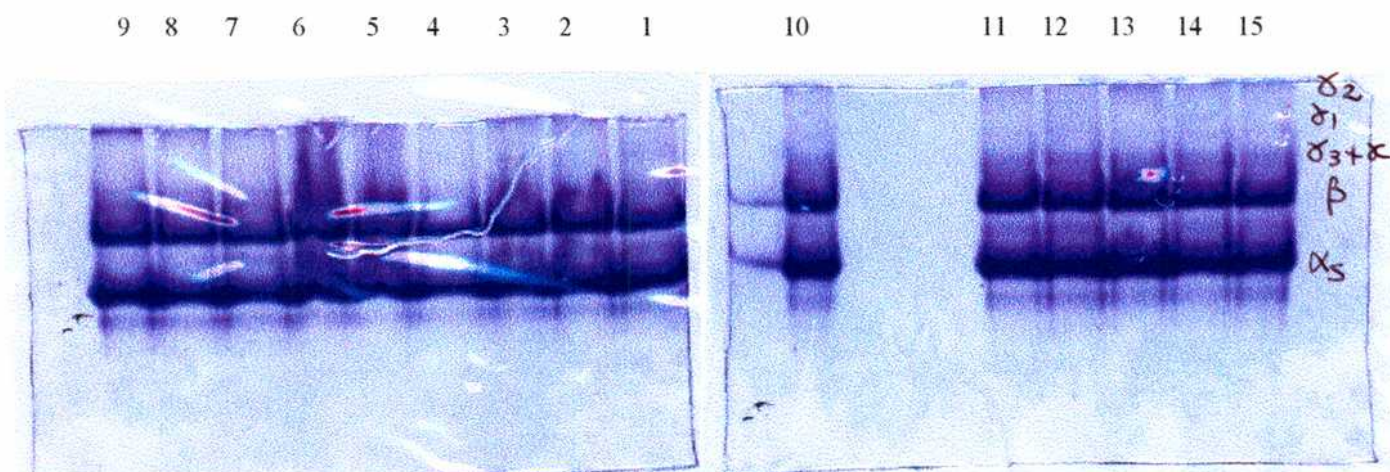
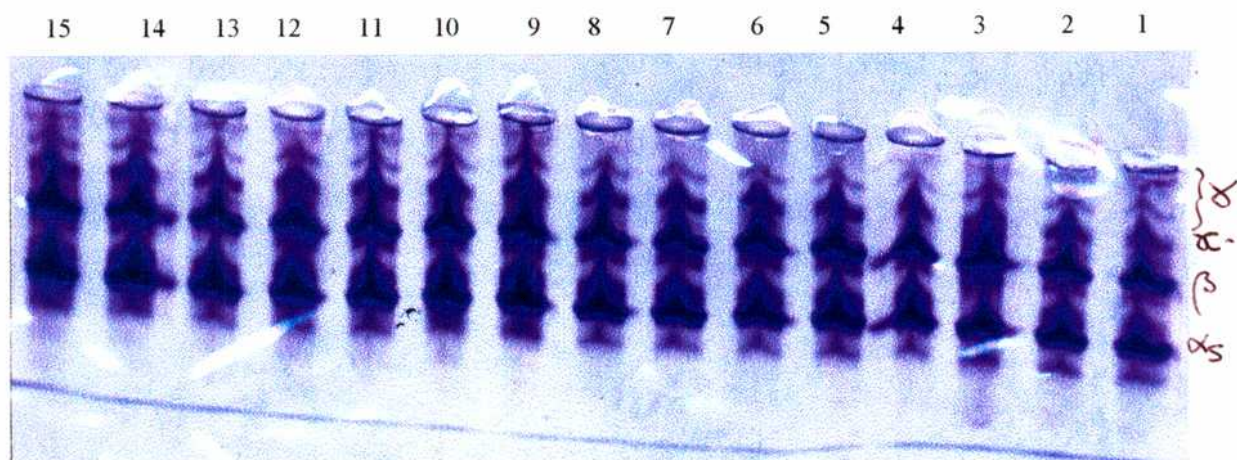


FIGURA N° 12. ELECTROFORESIS HORIZONTAL Y VERTICAL. MUESTRAS DE LECHE CRUDA SOMETIDAS A 0, 2, 6 Y 8 DÍAS DE REFRIGERACION.



- Línea 1:** Leche cruda (37) con 320.000 cs/ml, 2.3×10^6 ufc/ml y 0 días de refrigeración.
Línea 2: Leche 37 con 2 días de refrigeración. **Línea 3:** Leche 37 con 6 días de refrigeración.
Línea 4: Leche cruda (38) con 160.000 cs/ml, 1.2×10^6 ufc/ml y 0 días de refrigeración.
Línea 5: Leche cruda 38 con 2 días de refrigeración. **Línea 6:** Leche cruda 38 con 6 días de refrigeración.
Línea 7: Leche cruda (39) con 150.000 cs/ml, $> 3 \times 10^6$ ufc/ml y 0 días de refrigeración.
Línea 8: Leche (39) con 2 días de refrigeración. **Línea 9:** Leche (39) con 6 días de refrigeración.
Línea 10: Leche cruda (40) con 550.000 cs/ml, 2×10^6 ufc/ml y 0 días de refrigeración.
Línea 11: Leche 40 con 2 días de refrigeración. **Línea 12:** Leche 40 con 6 días de refrigeración.
Línea 13: Leche cruda (41) con 600.000 cs/ml, 1.1×10^5 ufc/ml y 0 días de refrigeración.
Línea 14: Leche 41 con 2 días de refrigeración. **Línea 15:** Leche 41 con 6 días de refrigeración.

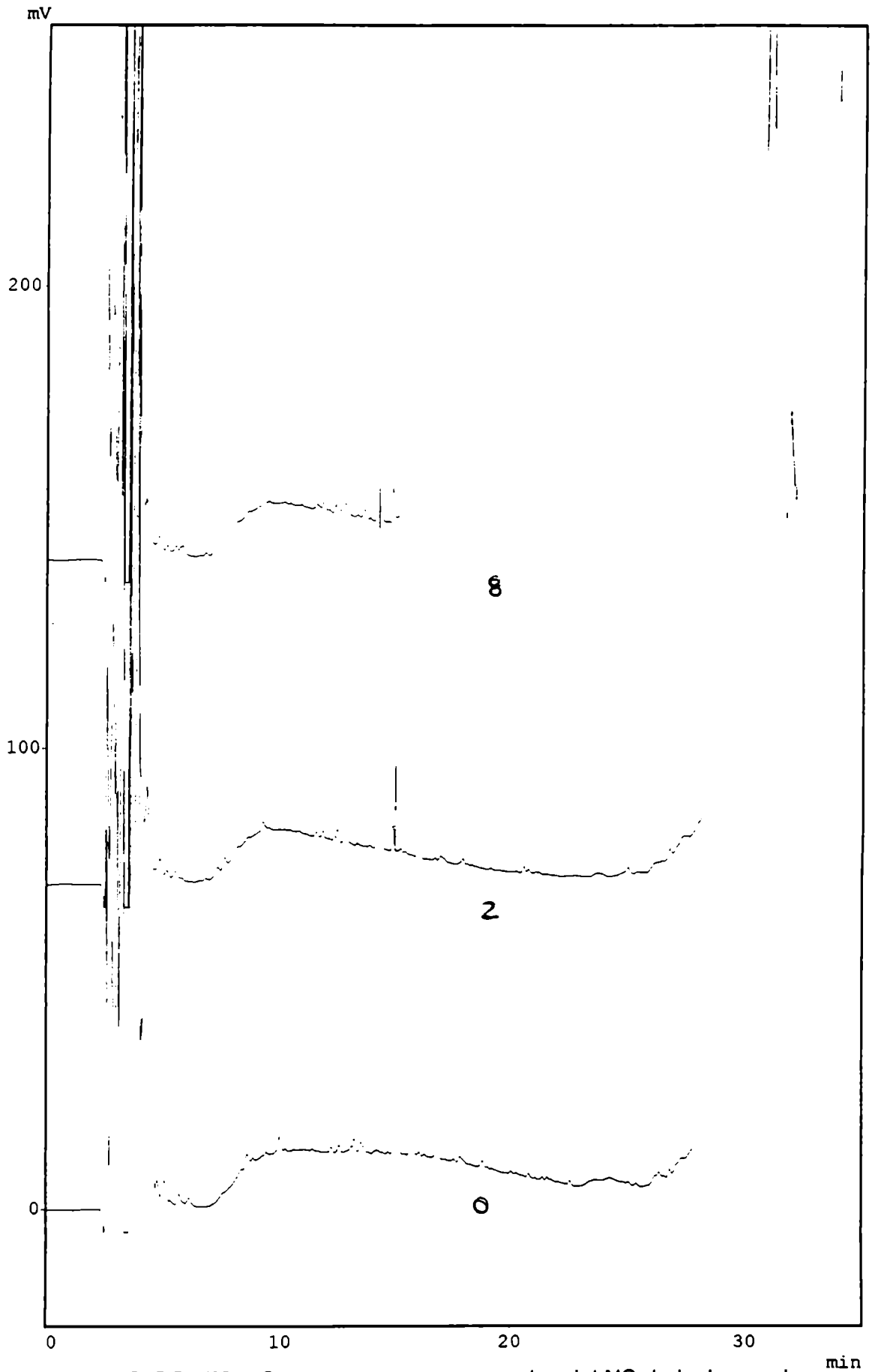


GRAFICO N°21. Cromatogramas comparados del NS de leche cruda con 0, 2 y 8 días de refrigeración.

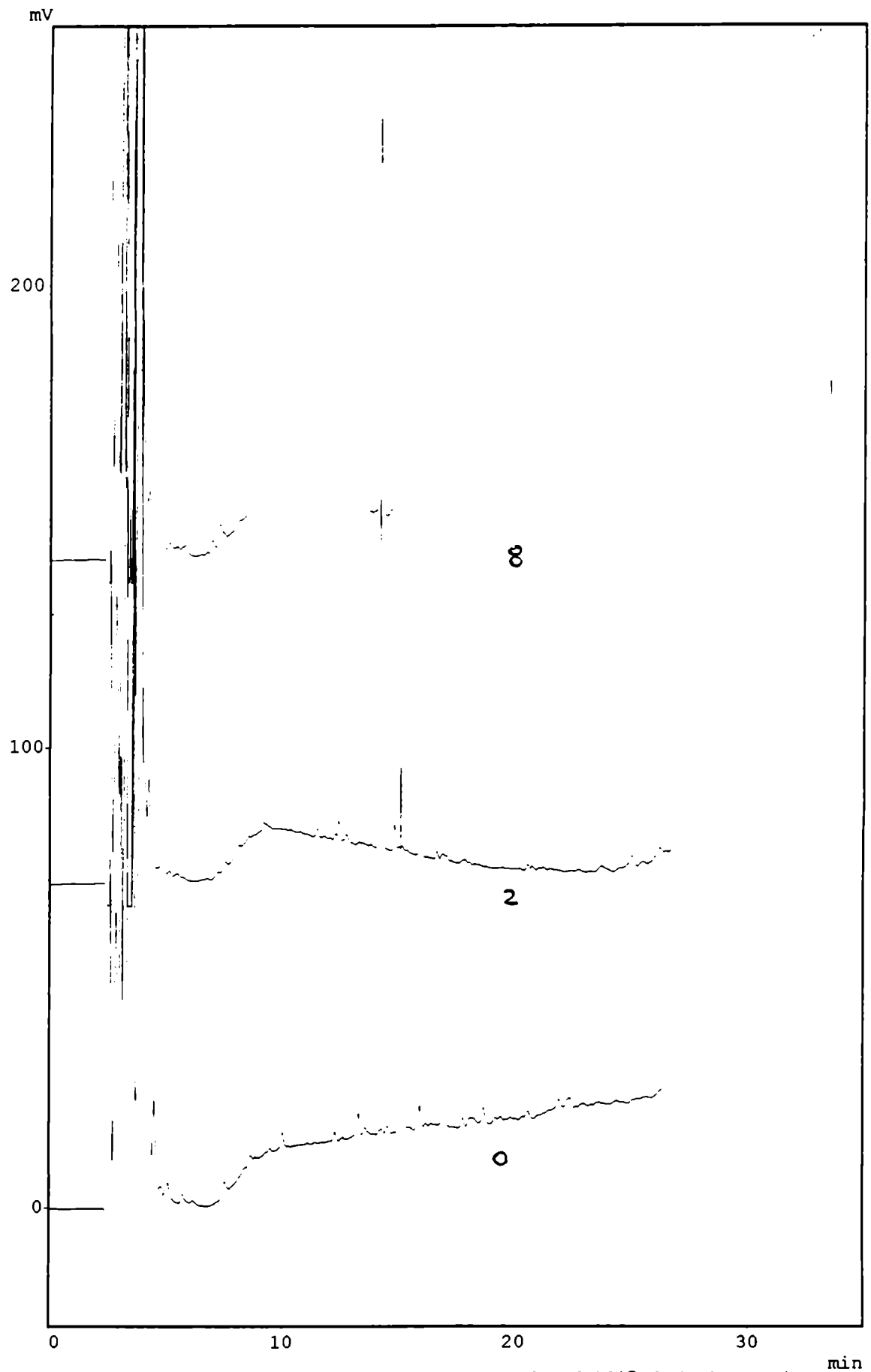


GRAFICO N°22. Cromatogramas comparados del NS de leche cruda con 0, 2 y 8 días de refrigeración.

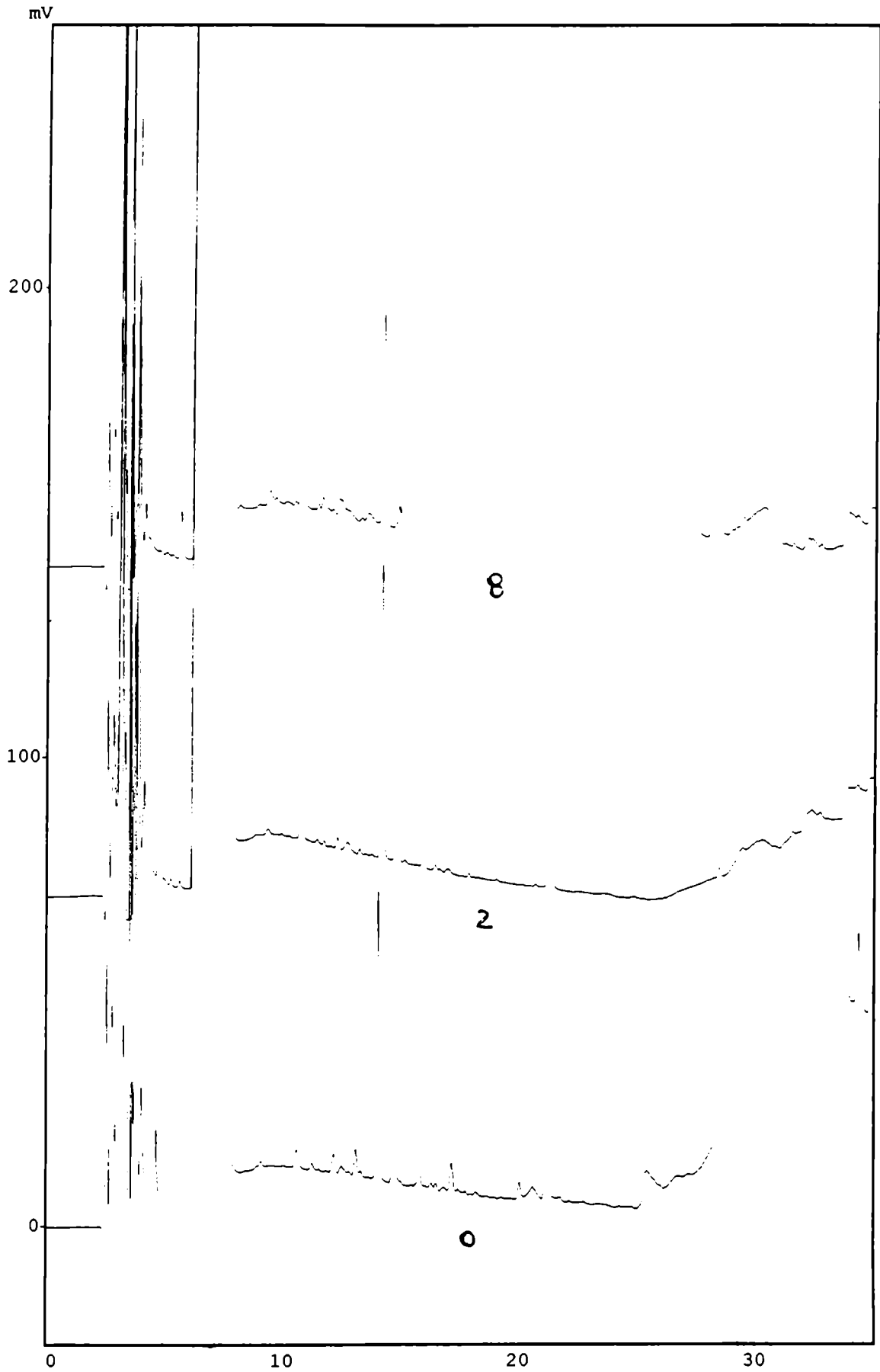


GRAFICO N°23. Cromatogramas comparados del NNP de leche cruda con 0, 2 y 8 días de refrigeración.

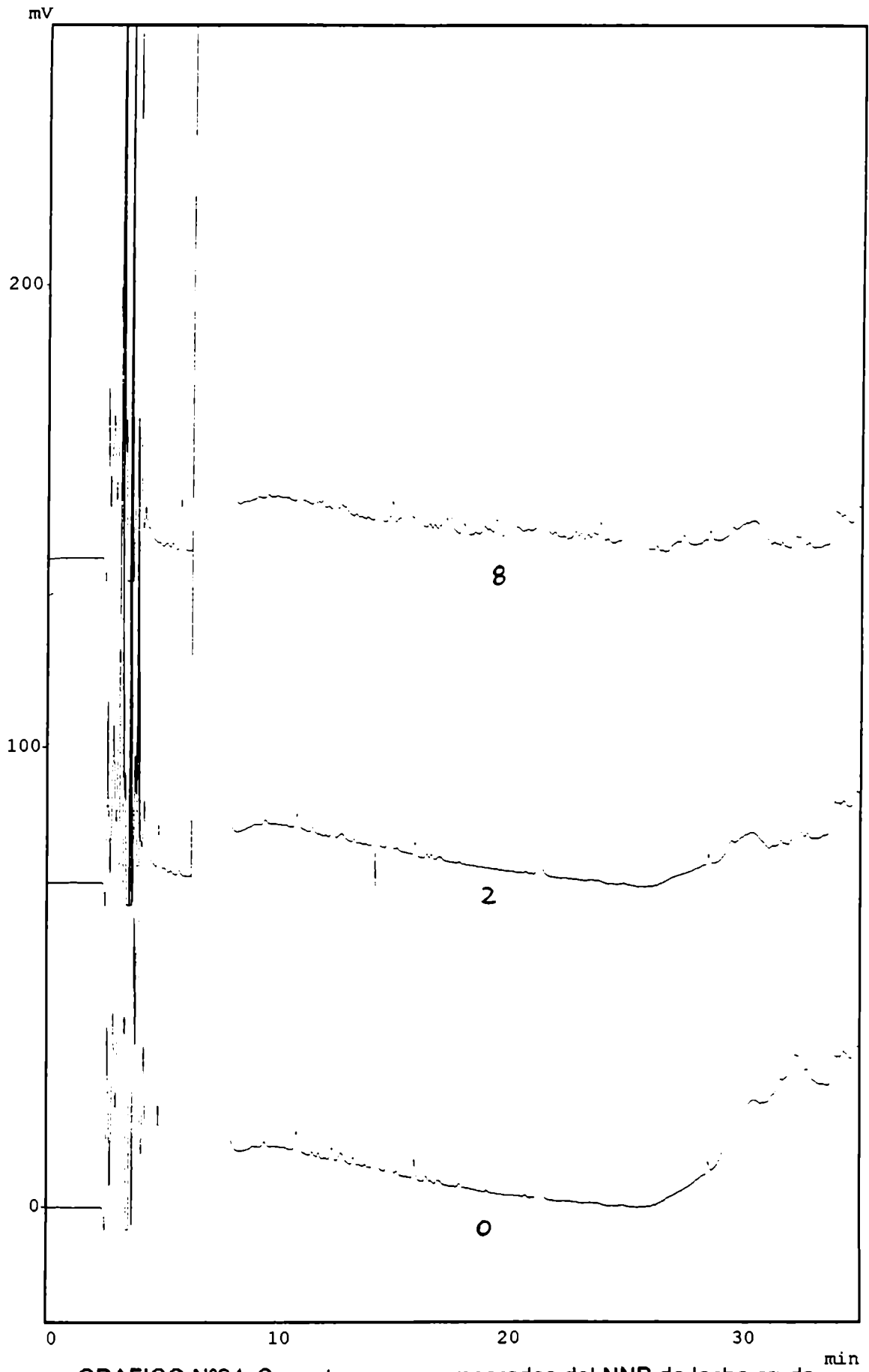


GRAFICO N°24. Cromatogramas comparados del NNP de leche cruda con 0, 2 y 8 días de refrigeración.

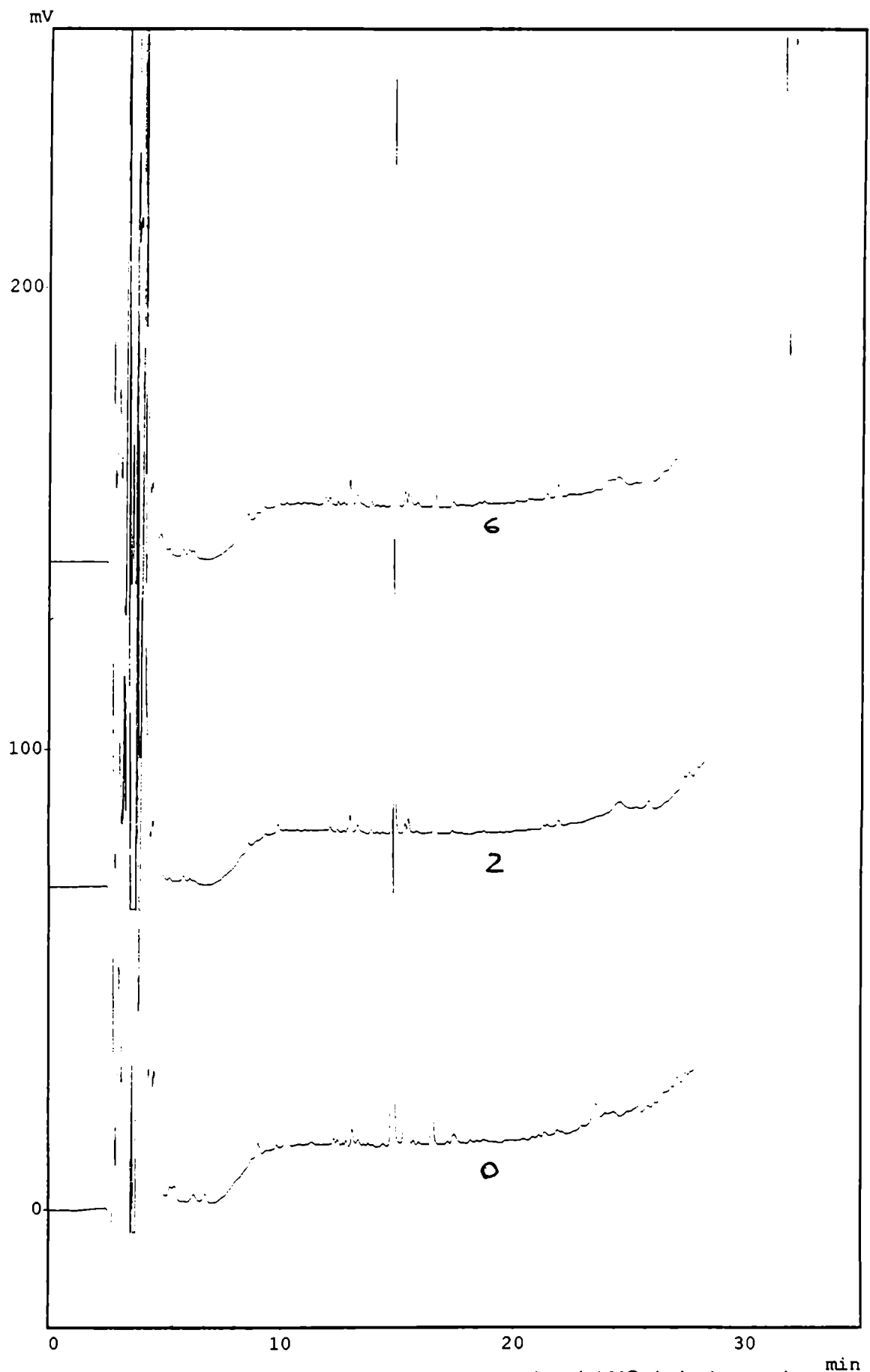


GRAFICO N°25. Cromatogramas comparados del NS de leche cruda con 0, 2 y 6 días de refrigeración.

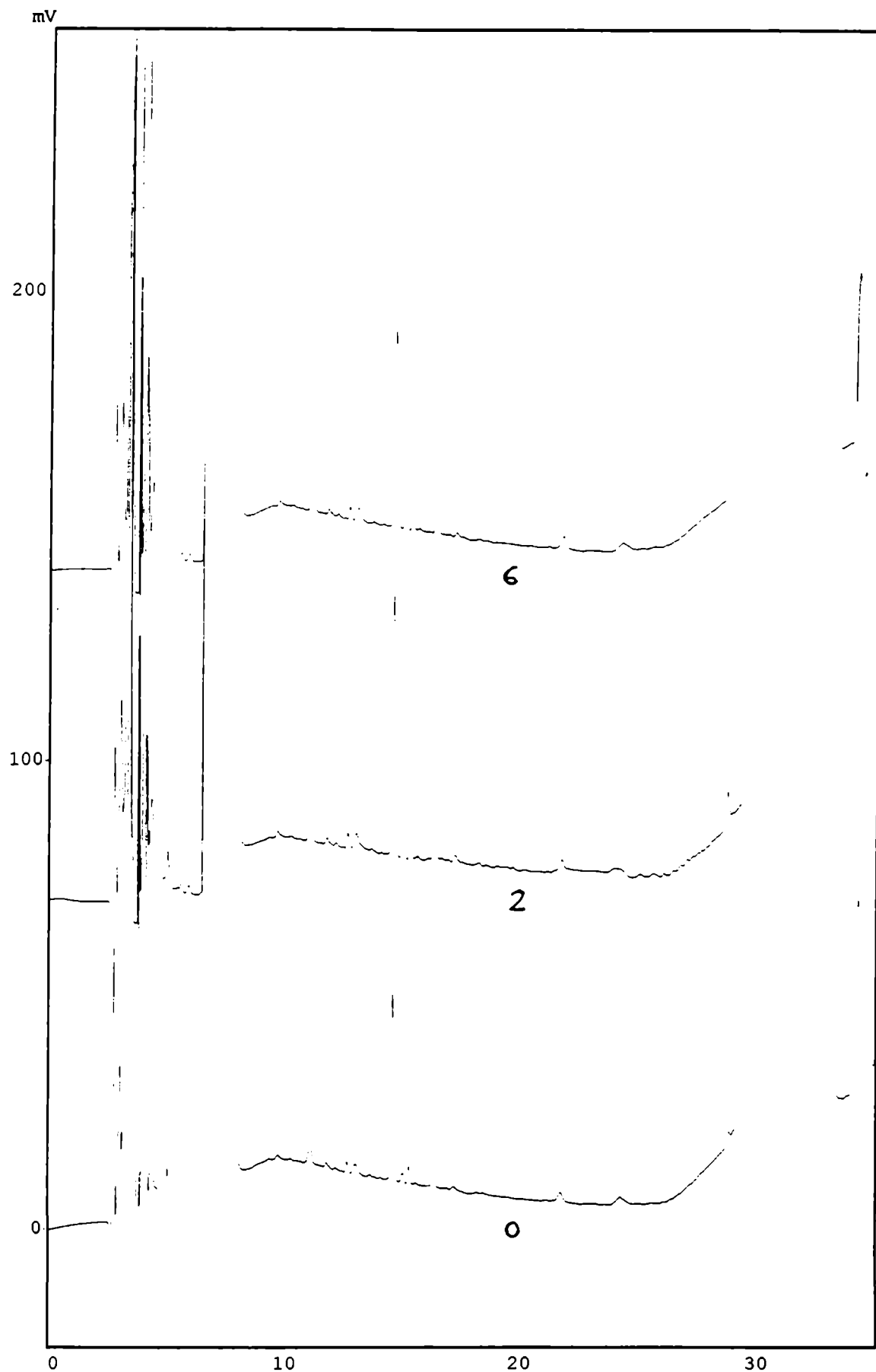
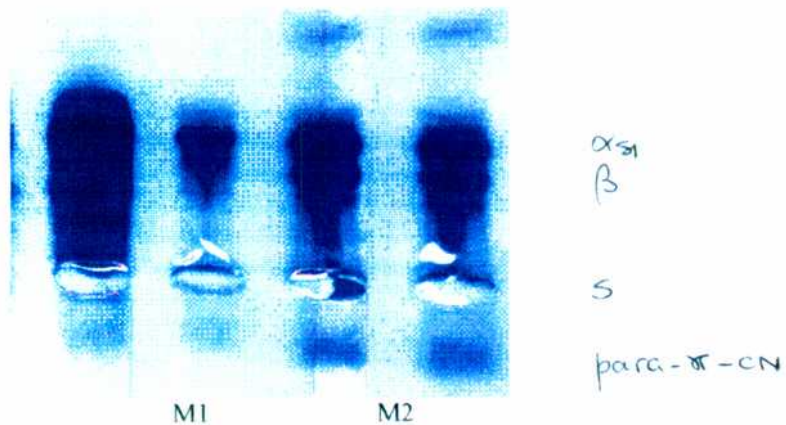


GRAFICO N°26. Cromatogramas comparados del NNP de leche cruda con 0, 2 y 6 días de refrigeración.

FIGURA N°13. ELECTROFORESIS HORIZONTAL DEL COAGULO Y SOBRENADANTE DE UNA LECHE UAT COAGULADA EN ESTANTERIA.



Línea M1: leche UAT coagulada en estantería. muestra del coágulo

Línea M2: leche UAT coagulada en estantería. muestra del sobrenadante

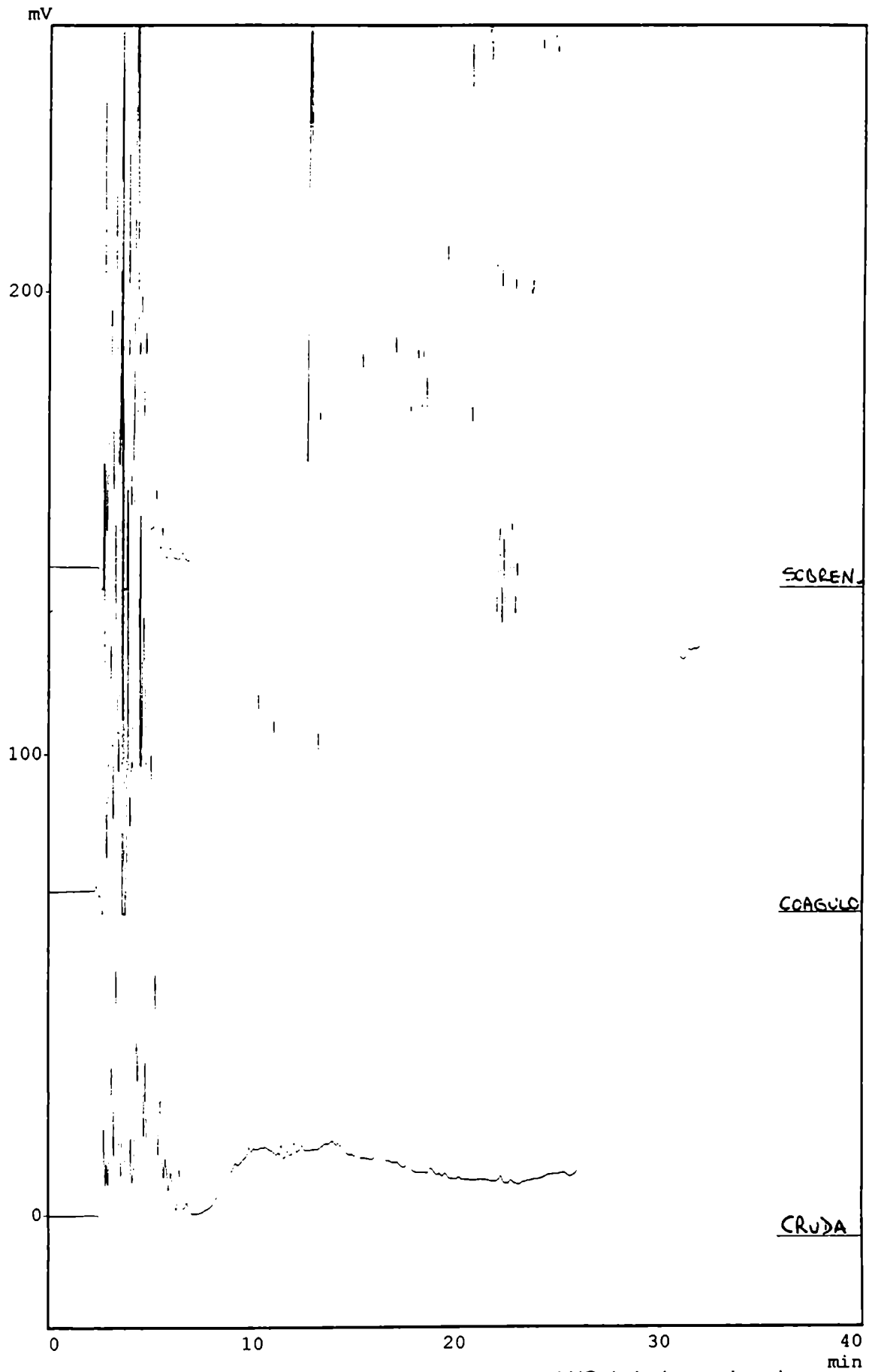


GRAFICO N°27. Cromatogramas comparados del NS de leche cruda y de muestras de coágulo y sobrenadante de leche UAT coagulada en estantería.

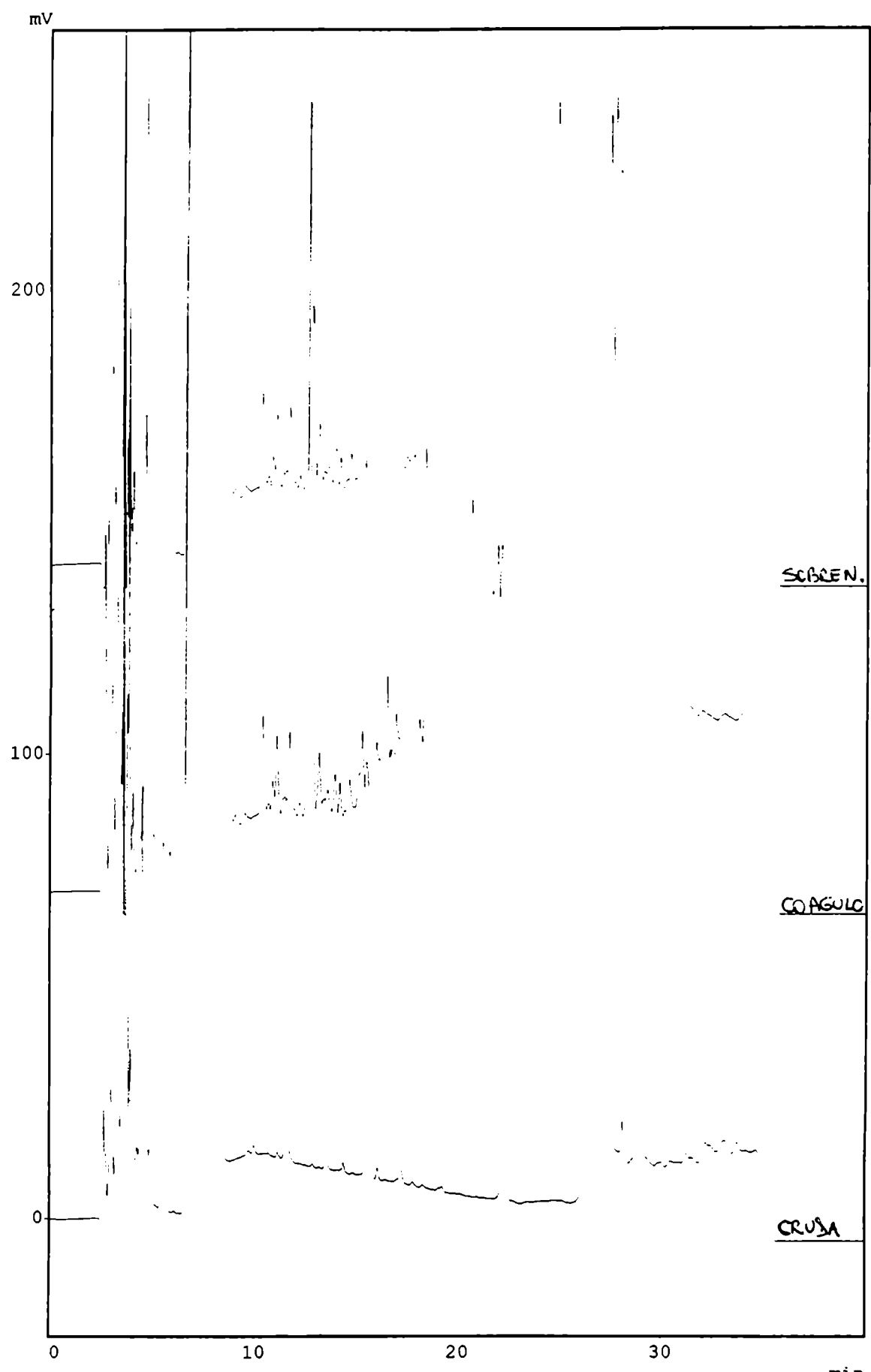


GRAFICO N°28. Cromatogramas comparados del NNP de leche cruda y de muestras de coágulo y sobrenadante de leche UAT coagulada en estantería.

V. CONCLUSIONES

Para las muestras analizadas:

- La electroforesis permitió obtener un perfil nitrogenado característico para la leche cruda mostrando pequeñas diferencias según el RCS/ml. La HPLC mostró dos tipos de perfil del NS y del NNP para muestras de bajo RCS/ml y permitió evidenciar la presencia de productos de hidrólisis en muestras con altos RCS/ml, indicando un deterioro proteico.
- El perfil nitrogenado obtenido de la leche cruda varió respecto al de la leche tratada térmicamente.
- El perfil nitrogenado de la leche cruda presentó variaciones, perceptibles por los métodos utilizados, a los 8 días de refrigeración cuando el recuento de bacterias mesófilas viables totales alcanzó el rango de 10^7 - 10^8 ufc/ml. No se detectaron, en cambio, modificaciones a los 6 días de incubación.
- La leche mantenida en refrigeración por el término de 2 días no sufrió alteraciones de las proteínas, en cuanto a las observaciones electroforéticas y sus perfiles de NS y NNP.
- La detección del CMP mediante HPLC de la fracción del NS principalmente, permitiría predecir la aptitud de la leche cruda para ser sometida a un tratamiento térmico y estimar su vida útil potencial.

VI. BIBLIOGRAFIA

- ◆ ADAMS, D. and J. BARACH (1976). Effect of psychrotrophic bacteria from raw on milk proteins. *J. of Dairy Sci.* 59:823-827.
- ◆ ADDEO, F., G. GARRO, N. INTORCIA, L. PELLEGRINO, P. RESMINI and L. CHIANESE (1995). Gel electrophoresis and immunoblotting for the detection of casein proteolysis in cheese. *Journal of Dairy Res.* 62:297-309.
- ◆ AIMUTIS, W. and W. EIGEL (1982). Identification of λ -casein as plasmin-derived fragments of bovine α s1-casein. *J. of Dairy Sci.* 65:175-181.
- ◆ ANDREWS, A. (1983). Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Res.* 50:45-55.
- ◆ ANDREWS, A. and E. ALICHANIDIS (1983). Proteolysis of caseins and the proteose-peptone fraction of bovine milk. *Journal of Dairy Res.* 50:275-290.
- ◆ AULDIST, M., S. COATS, B. SUTHERLAND, J. MAYES, G. McDOWELL and G. ROGERS (1996). Effects of somatic cell count and stage of lactation on raw milk composition and the yield and quality of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Res.* 63:269-280.
- ◆ BALDI, A., G. SAVOINI, F. CHELI, F. FANTUZ, E. SENATORE, L. BERTOCCHI and I. POLITIS (1996). Changes in plasmin-plasminogen-plasminogen activator system in milk from Italian Friesian Herds. *Int. Dairy Journal* 6:1045-1053.
- ◆ BALLOU, L.U., M. PASQUINI, R. BREMEL, T. EVERSON and D. SOMMER (1995). Factors affecting herd milk composition and milk plasmin at four levels of somatic cell counts. *Journal of Dairy Sci.* 78:2186-2195.
- ◆ BASTIAN, E. , R. BROWN and C. ERNSTROM (1991). Plasmin activity and milk coagulation. *J. of Dairy Sci.* 74:3677-3685.

- ◆ BASTIAN, E. and R. BROWN (1996). Plasmin in milk and dairy products: an update. *Int. Dairy Journal* 6:435-457.
- ◆ BICAN, P. and A. SPAHNI (1993). Proteolysis in Swiss-type cheeses: a high-performance liquid chromatography study. *Int. Dairy J.* 3:73-84.
- ◆ BUELINK, D., SCHALLER, A. Y LABRIOLA, S. (1996). Principales Cuencas lecheras argentinas. Secretaría de Agricultura, Pesca y Alimentación. Subsecretaría de Alimentación. Departamento de Lechería.
- ◆ CEE, 1992. Diario Oficial de la Comunidad Europea. Directiva 92/46/CE del Consejo 16 de Junio. Doce, L268. En "Calidad de leche bovina y ovina. Normativas para Exportación de Terceros Países a la Unión Europea". Dra. María Pilar Molina Pons (España). Septiembre 1997.
- ◆ COLLIN, J., J. BERDAGUE, M. DOGNIN-BERGERET et R. GRAPPIN (1987). Affinage et qualité du Gruyère de Comté. IV. Etude de la protéolyse. *Le Lait* 67 (3):299-318.
- ◆ COLLIN, J., A. KOKELAAR, O. ROLLET-REPECAUD et A. DELACROIX-BUCHET (1991). Dosage des caséines du lait de vache par électrophorèse et par chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (FPLC): comparaison des résultats. *Lait* 71:339-350.
- ◆ COLLINS, S.J., B.H. BESTER and A.E. MCGILL (1993). Influence of psychrotrophic bacterial growth in raw milk on the sensory acceptance of UHT skim milk. *Journal of Food Protection* 56 (5):418-425.
- ◆ COOPER, T. (1977). The tools of biochemistry. Universitu of Pittsburgh. John Wiley ans sons. New York-London-Sydney-Toronto.
- ◆ CREAMER, L. and A.K. MacGIBBON (1996). Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids. *Int. Dairy Journal* 6: 539-568.
- ◆ DE KONING, P., R. de BOER, P. BOTH and P. NOOY (1981). Comparison of proteolysis in a low fat semi-hard type of cheese manufactured by standard and by ultrafiltration technique. *Neth. Milk Dairy J.* 35:35-46.

- ◆ DRIESSEN, F. (1983). Lipases and proteinases in milk. Occurrence, heat inactivation and their importance for the keeping quality of milk products. *Neth. Milk Dairy J.* 37:193-196.
- ◆ DZIUBA, J. and P. MINKIEWICZ (1996). Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of cow's κ -casein. *Int. Dairy Journal* 6: 1017-1044.
- ◆ EIGEL, W.N. (1977). Effect of bovine plasmin on α s1-B and κ -A caseins. *J. Dairy Sci.* 60:1399-1403.
- ◆ FARKYE, N. and P. FOX (1992). Contribution of plasmin to Cheddar cheese ripening: effect of added plasmin. *Journal of Dairy Res.* 59:209-216.
- ◆ FARKYE, N. (1995). Contribution of milk-clotting enzymes and plasmin to cheese ripening. In *Chemistry of structure-function relationships in cheese*. Plenum Press, New York.
- ◆ GALETTO, A. (1996). Situación actual y perspectivas del mercado internacional de productos lácteos. Publicación miscelánea N° 79. INTA- Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Centro Regional Santa Fé.
- ◆ GALLARDO, M., ONETTI, S., CASTILLO, A. Y NARI, J. (1996). Proteína en leche y su relación con el manejo nutricional. Informe Técnico N° 56. INTA Estación Experimental Agropecuaria Rafaela.
- ◆ GEBRE-EGZIABHER, A., E. HUMBERT and G. BLANKENAGEL (1980). Hydrolysis of milk proteins by microbial enzymes. *J. of Food Protection* 43:709-712.
- ◆ GILMORE, J.A., J.H. WHITE, B. ZAVIZION and I. POLITIS (1995). Effects of stage of lactation and somatic cell count on plasminogen activator activity in bovine milk. *Journal of Dairy Research* 62:141-145.
- ◆ GILLIS, W., M. CARTLEDGE, I. RODRIGUEZ and E. SUAREZ (1985). Effect of raw milk quality on ultra-high temperature processed milk. *J. Dairy Sci.* 68:2875-2879.

- ◆ GONZALEZ DE LLANO, D., M. POLO and M. RAMOS (1995). Study of proteolysis in Artisanal cheeses: high performance liquid chromatography of peptides. *Journal of Dairy Sci* 78:1018-1024.
- ◆ GUINOT-THOMAS, P., M. AL AMMOURY Y. Le ROUX and F. LAURENT (1995a). Study of proteolysis during storage of raw milk at 4°C: Effect of plasmin and microbial proteinases. *International Dairy Journal* 5:685-697.
- ◆ GUINOT-THOMAS, P., M. AL AMMOURY and F. LAURENT (1995b). Effects of storage conditions on the composition of raw milk. *International Dairy Journal* 5:211-223.
- ◆ HALPAAP, I., E. REIMERDES and H. KLOSTERMEYER (1977). Milk proteinases. VI. Comparative isolation of plasminogen from bovine blood and a proteinase from cow's milk. *Milchwissenschaft* 32:341-346.
- ◆ HARWALKAR, V.R., H. CHOLETTE, R.C. McKELLAR and D.B. EMMONS (1993). Relation between proteolysis and astringent off-flavor in milk. *Journal of Dairy Science* 76:2521-2527.
- ◆ HEEGARD, C., J. WHITE, B. ZAVIZION, J. TURNER and Y. POLITIS (1994). Production of various forms of plasminogen activator and plasminogen inhibitor by cultured mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Sci* 77:2949-2958.
- ◆ HURLEY, W.L. (1997). *Lactation biology. Milk protein and protein synthesis.* University of Illinois. Urbana-Champaign.
- ◆ IDF (International Dairy Federation) 100B:1991. Milk and milk products. Enumeration of microorganisms. Colony count technique at 30°C.
- ◆ IDF (International Dairy Federation) 101A:1991. Milk. Enumeration of psychrotrophic micro-organisms. Colony count technique at 6.5°C.
- ◆ INFORTAMBO (1999) N°122:144. Información Estadística. Subsecretaría de Alimentación y Mercados. Lechería.

- ◆ JAMES, R. (1997). INDUSTRIA LECHERA N° 707:9-22.
- ◆ KELLY, A and J. FOLEY (1997). Proteolysis and storage stability of UHT milk as influenced by milk plasmin activity, plasmin β -lactoglobulin complexation, plasminogen activation and somatic cell count. *Int. Dairy Journal* 7:411-420.
- ◆ KENNEDY, A. and A. KELLY (1997). The influence of somatic cell count on the heat stability of bovine milk plasmin activity. *Int. Dairy Journal* 7:717-721.
- ◆ KNUTSON, R.J., D.D. MACKENZIE, S.R. DAVIS and S.N. MCCUTCHEON (1993). The effect of once daily milking on concentrations and yields of plasminogen, plasmin and other whey proteins. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 53:155-158.
- ◆ KORYCKA-DAHL, M., B. RIBADEAU DUMAS, N. CHEN and J. MARTAL (1983). Plasmin activity in milk. *Journal of Dairy Sci* 66:704-711.
- ◆ LAW, B. (1979). Reviews of the progress of dairy science. Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. *J. of Dairy Res.* 46:573-588.
- ◆ LAW, B., A. ANDREWS, A. CLIFFE, M. SHARPE and H. CHAPMAN (1979). Effect of proteolytic raw milk psychrotrophs on cheddar cheese making with stored milk. *J. of Dairy Res.* 46:487-508.
- ◆ LE BARS, D. et J. GRIPON (1993). Hydrolysis of α s1-casein by bovine plasmin. *Lait* 73:337-344.
- ◆ LE ROUX, Y., O. COLIN and F. LAURENT (1995). Proteolysis in samples of quarter milk with varying somatic cell counts. 1. Comparison of some indicators of endogenous proteolysis in milk. *Journal of Dairy Sci.* 78:1289-1297.
- ◆ LE ROUX, Y., J. GIRARDET, G. HUMBERT, F. LAURENT and G. LINDEN (1995). Proteolysis in samples of quarter milk with varying

somatic cell counts. 2. Component in samples PP3 and β -casein-1P (f29-105 and f29-107) of the proteose-peptone fractions. *Journal of Dairy Sci.* 78:1298-1305.

- ◆ LOPEZ-FANDIÑO, R., A. OLANO, N. CORZO and M. RAMOS (1993a). Proteolysis during storage of UHT milk: differences between whole and skim milk. *Journal of Dairy Res.* 60:339-347.
- ◆ LOPEZ-FANDIÑO, R., A. OLANO, C. SAN JOSE and M. RAMOS (1993b). Application of reversed-phase HPLC to the study of proteolysis in UHT milk. *Journal of Dairy Res.* 60:111-116.
- ◆ LU, D.D. and S.S. NIELSEN (1993). Isolation and characterization of native bovine milk plasminogen activators. *Journal of Dairy Science* 76:3369-3383.
- ◆ MAC KELLAR, R. (1981). Development of off-flavors in ultra-high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. *J of Dairy Res.* 64:2138-2145.
- ◆ McKELLAR, R. (1989). *Enzymes of psychrotrophs in raw food.* CRC Press, Inc. 310 pp
- ◆ MEPHAM, T. (1983). *Biochemistry of lactation.* Elsevier, Amsterdam-New York. 500 pp.
- ◆ MEPHAM, T. (1987). *Physiology of lactation.* Open University Press. 206 pp.
- ◆ MONTES, A.L. (1966). *Bromatología.* Editorial Universitaria de Buenos Aires. 531 pp.
- ◆ MOTTAR, J., R. VAN RENTERGHEM and J. DE VILDER (1985). Evaluation of the raw material for UHT milk by determining the degree of protein breakdown through HPLC. *Milchwissenschaft* 40 (12):717-721.

- ◆ MUSET, G., LAYA, E. y H. MONTERO (1987). Studio della maturazione di un tipo di formaggio Pategras Argentino. II. Evoluzione delle frazioni caseiniche. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 38(6):561-573.
- ◆ PICARD, C., I. PLARD, D. RONGDAUX-GAIDA and J.C. COLLIN (1994). Detection of proteolysis in raw milk stored at low temperature by an inhibition ELISA. *Journal of Dairy Res.* 61:395-404.
- ◆ PLARD, Y. (1990). Rapport Bibliographique. Le role des psychrotrophes dans la proteolyse du lait. ENSAR.
- ◆ POLITIS, I., E. LACHANCE, E. BLOCK and J. TURNER (1989a). Plasmin and plasminogen in bovine milk: a relationship with involution. *J. of Dairy Sci.* 72:900-926.
- ◆ POLITIS, I., K. Ng KWAI HANG and R. GIROUX (1989b). Environmental factors affecting plasmin activity in milk. *J. of Dairy Sci.* 72:1713-1718.
- ◆ POLITIS, I., J. WHITE, B. ZAVIZION, J. GOLDBERG, M.GUO and P.KINDSTEDT (1995). Effect of individual caseins on plasminogen activation by bovine urokinase-type and tissue-type plasminogen activators. *Journal of Dairy Sci.* 78:484-490
- ◆ PROSSER, C.G., G. NICHOLAS, K.STELWAGEN, S.J.LACY-HULBERT, M.W. WOOLFORD and T.B. McFADDEN (1995). Influence of milking frequency and feeding level on plasmin activity and casein degradation in milk. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 55: 9-11.
- ◆ RAVANEL, C. (1988). Etude de la proteolyse des laits par HPLC. Memoire en vue de l'obtention du Diplome D'agronomie approfondie. Institut National Agronomique Paris-Grignon.
- ◆ RAVANIS, S. and M. LEWIS (1995). Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. *Letters in Applied Microbiology* 20:164-167.

- ◆ REARTE, D. (1992). Alimentación y composición de la leche en los sistemas pastoriles. Centro Regional Buenos Aires Sur (CERBAS). INTA Estación Experimental Agropecuaria Balcarce. 94 pp.
 - ◆ REINHEIMER, J. Y M. CANDIOTI (1994). Actividad y termoresistencia de enzimas exocelulares de bacterias psicrótrofas aisladas de leche cruda. La alimentación Latinoamericana N°202:39-46.
 - ◆ SAEMAN, A., R. VERDI, D. GALTON and D. BARBANO (1988). Effect of mastitis on proteolytic activity in bovine milk. *J. of Dairy Sci.* 71:505-512.
 - ◆ SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTACION (SAGPyA). MINISTERIO DE ECONOMIA Y OBRAS Y SERVICIOS PUBLICOS. Informe Estadístico de leche y productos lácteos. 1995.
 - ◆ SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTACION (SAGPyA). MINISTERIO DE ECONOMIA Y OBRAS Y SERVICIOS PUBLICOS. Informe Estadístico de leche y productos lácteos. 1996.
 - ◆ SHAH, N. (1994). Psychrotrophs in milk: a review. *Milchwissenschaft* 49(8):432-437.
- SNOEREN, T.H. and J. VAN RIEL (1979). Milk proteinase, its isolation and action on α s2- and β -casein. *Milchwissenschaft* 34:528-530.
- ◆ SNOEREN, T.H., C.A. van der SPEK, R. DEKKER and P.BOTH (1979). Proteolysis during the storage of UHT-sterilized whole milk. 1. Experiments with milk heated by the direct system for 4 seconds at 142°C. *Neth. Milk Dairy Journal* 33: 31-39.
 - ◆ SNOEREN, T. and P. BOTH (1981). Proteolysis during the storage of UHT sterilised whole milk. 2. Experiments with milk heated by the indirect system for 4 seconds at 142°C. *Neth. Milk and Dairy J.* 35:113-119.
 - ◆ SOLA, F. (1997). INDUSTRIA LECHERA N° 707: 7-8.

- ◆ SUAREZ, B. and C. FERREIRÓS (1991). Psychrotrophic flora of raw milk: resistance to several common disinfectants. *Journal of Dairy Res.* 58:127-136.
- ◆ URIEL, J. (1966). Méthode d'électrophorèse dans des gels d'acrylamide-agarose . *Bull. Soc. Chim. Biol.* 48:969-982.
- ◆ VILLAR, A., J. GARCIA, L. IGLESIAS, M. GARCIA and A. OTERO (1996). Application of principal component analysis to the study of microbial populations in refrigerated raw milk from farms. *Int. Dairy Journal* 6: 937-945.
- ◆ VISSER, S. (1981). Proteolytic enzymes and their action on milk proteins. A review. *Neth. milk Dairy Journal* 35:65-88.
- ◆ WHITE, J., B. ZAVIZION, K. O'HARE, J. GILMORE, M. GUO, P. KINDSTEDT and Y. POLITIS (1995). Distribution of plasminogen activator in different fractions of bovine milk. *Journal of Dairy Res.* 62:115-122.
- ◆ ZACHOS, T., I. POLITIS, R.C. GOREWIT and D.M. BARBANO (1992). Effect of mastitis on plasminogen activator activity of milk somatic cells. *Journal of Dairy Research* 59:461-467.
- ◆ ZALAZAR, C., C. MEINARDI Y L. CALABRESE (1990). Evaluación de la leche cruda destinada a quesería. *Revista Argentina de Lactología Año II* N°3:47-87.
- ◆ ZHANG, Z.P. and T. AOKI (1996). Behaviour of calcium and phosphate in bovine casein micelles. *Int. Dairy Journal* 6:769-780.

VII. ANEXO

LECHES CRUDAS

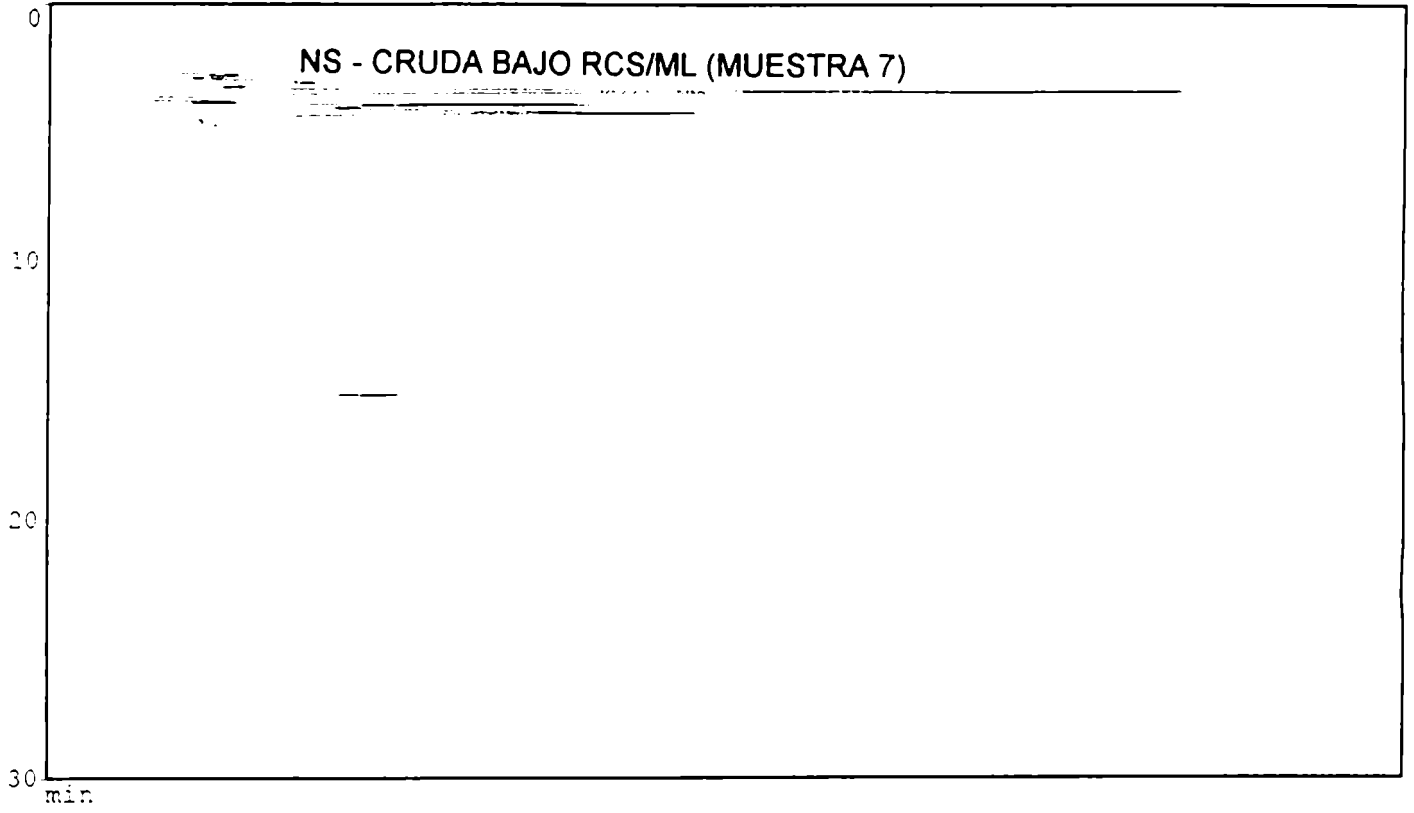
*** Chromatogram ***

mV

0

100

200

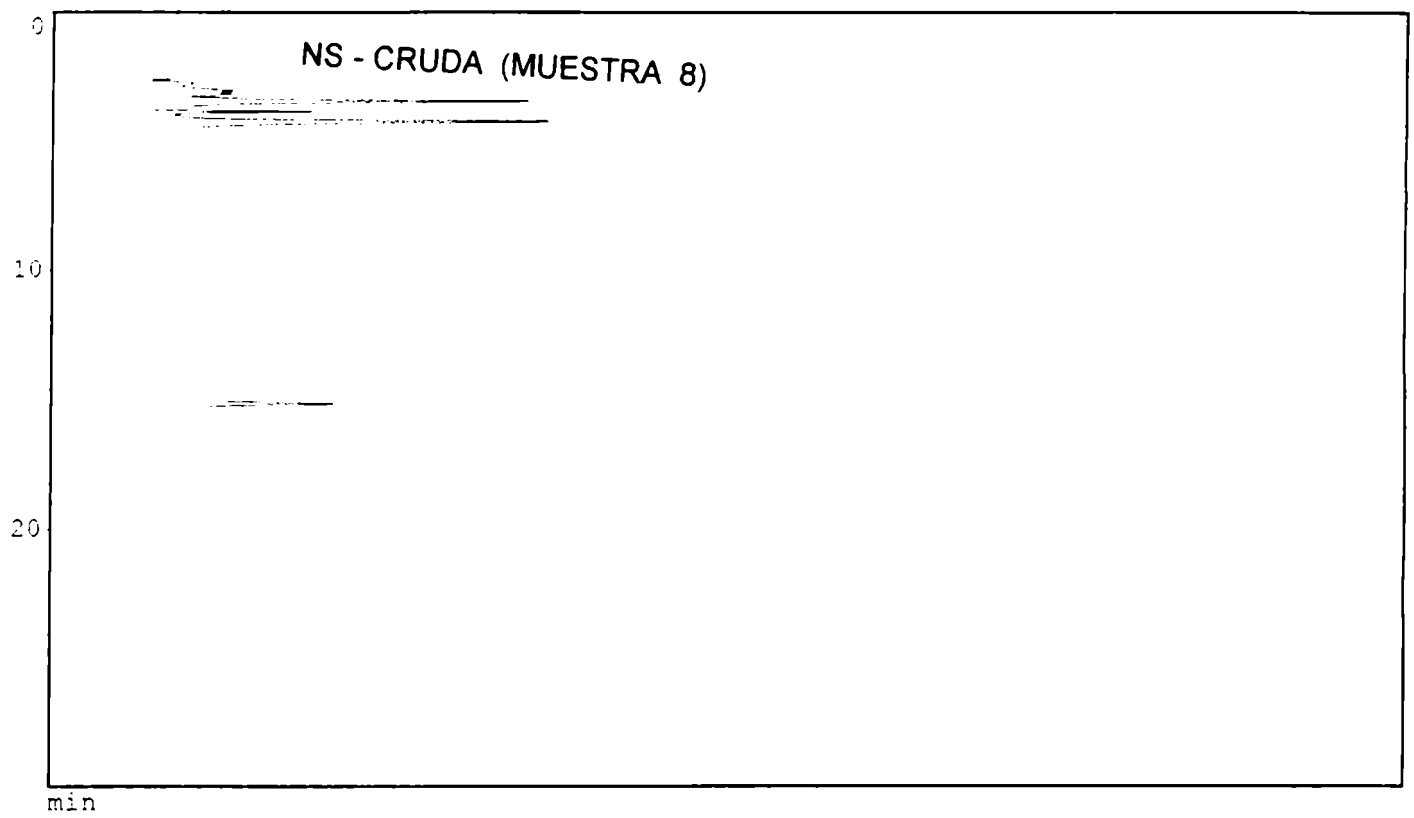


*** Chromatogram ***

mV

100

200



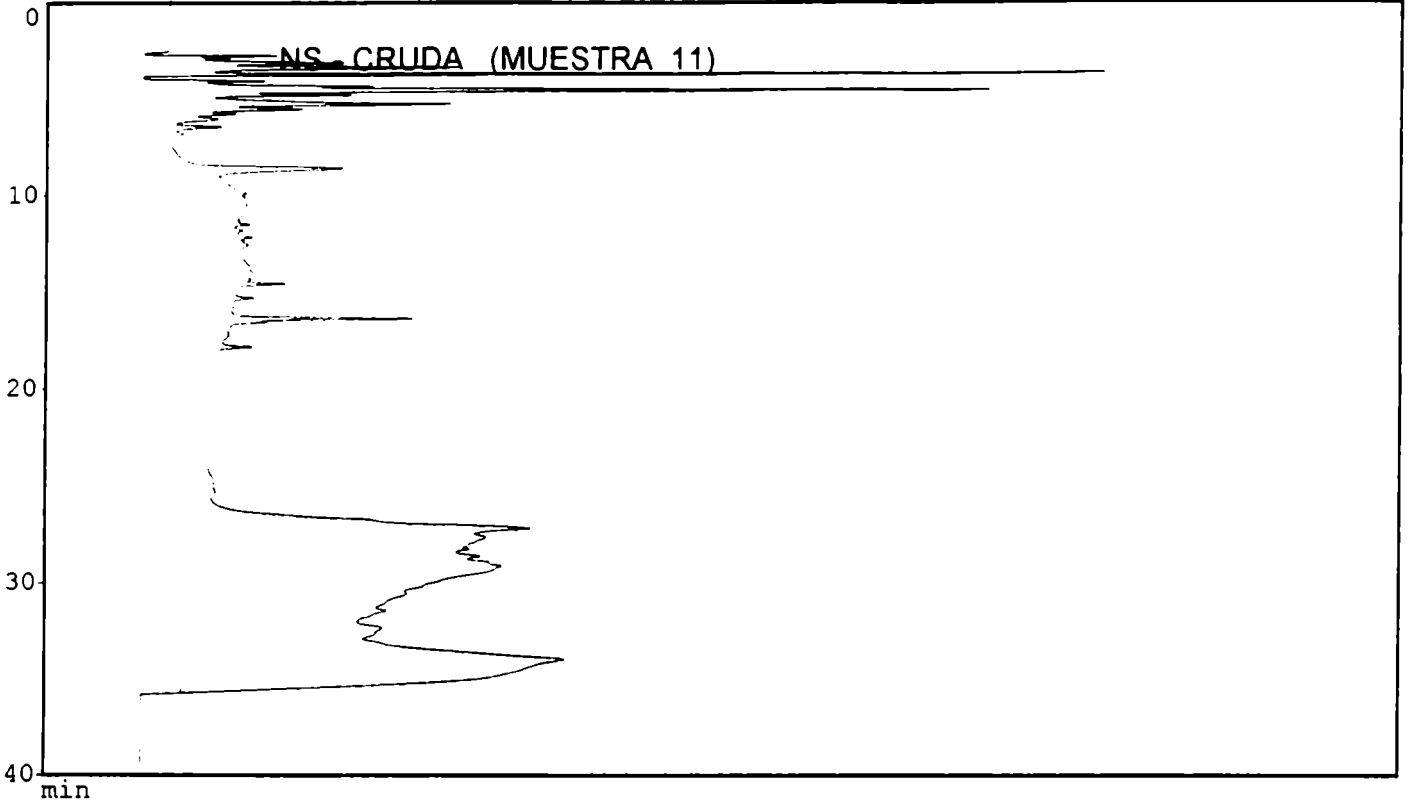
Chromatogram ***

mV

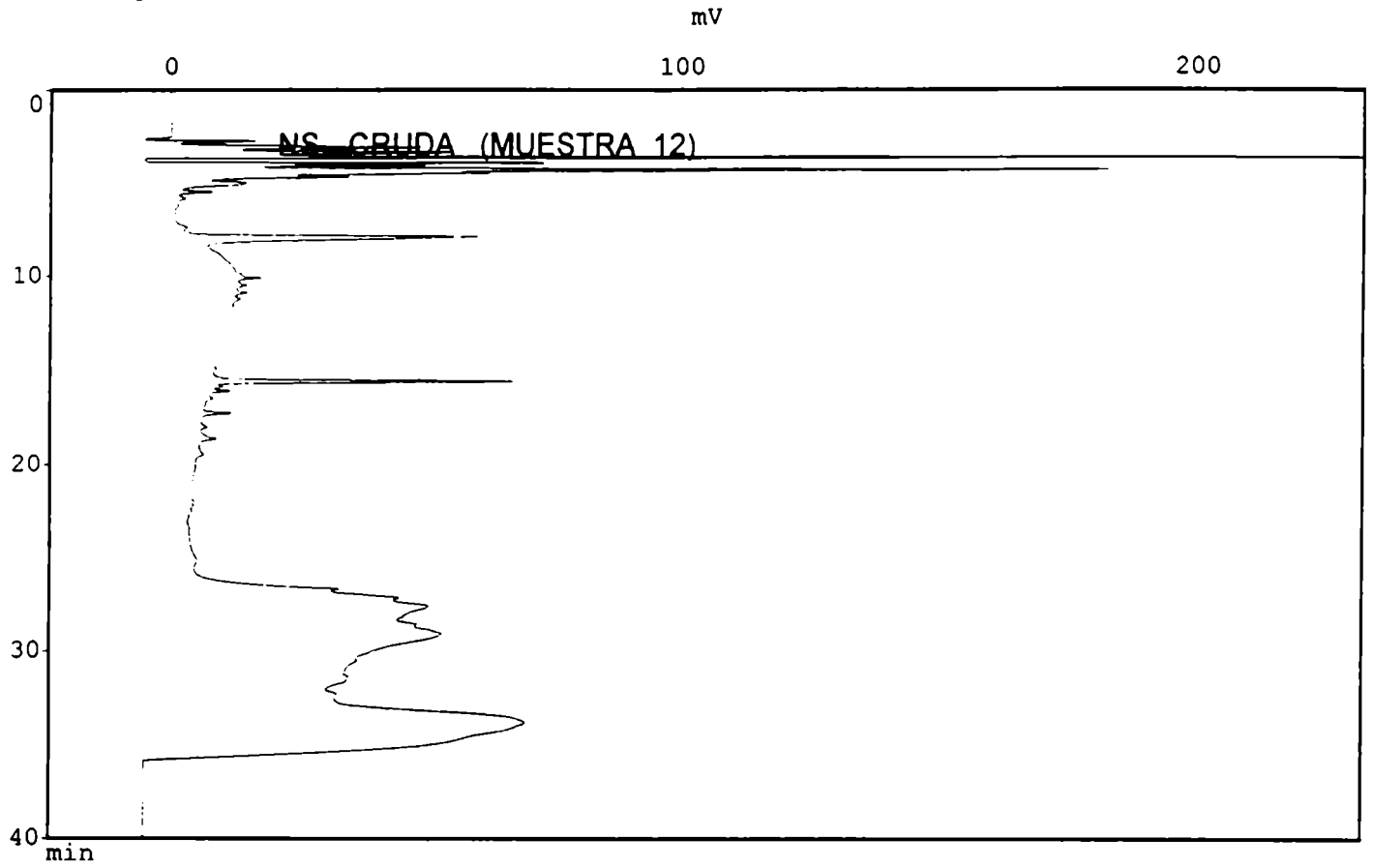
0

100

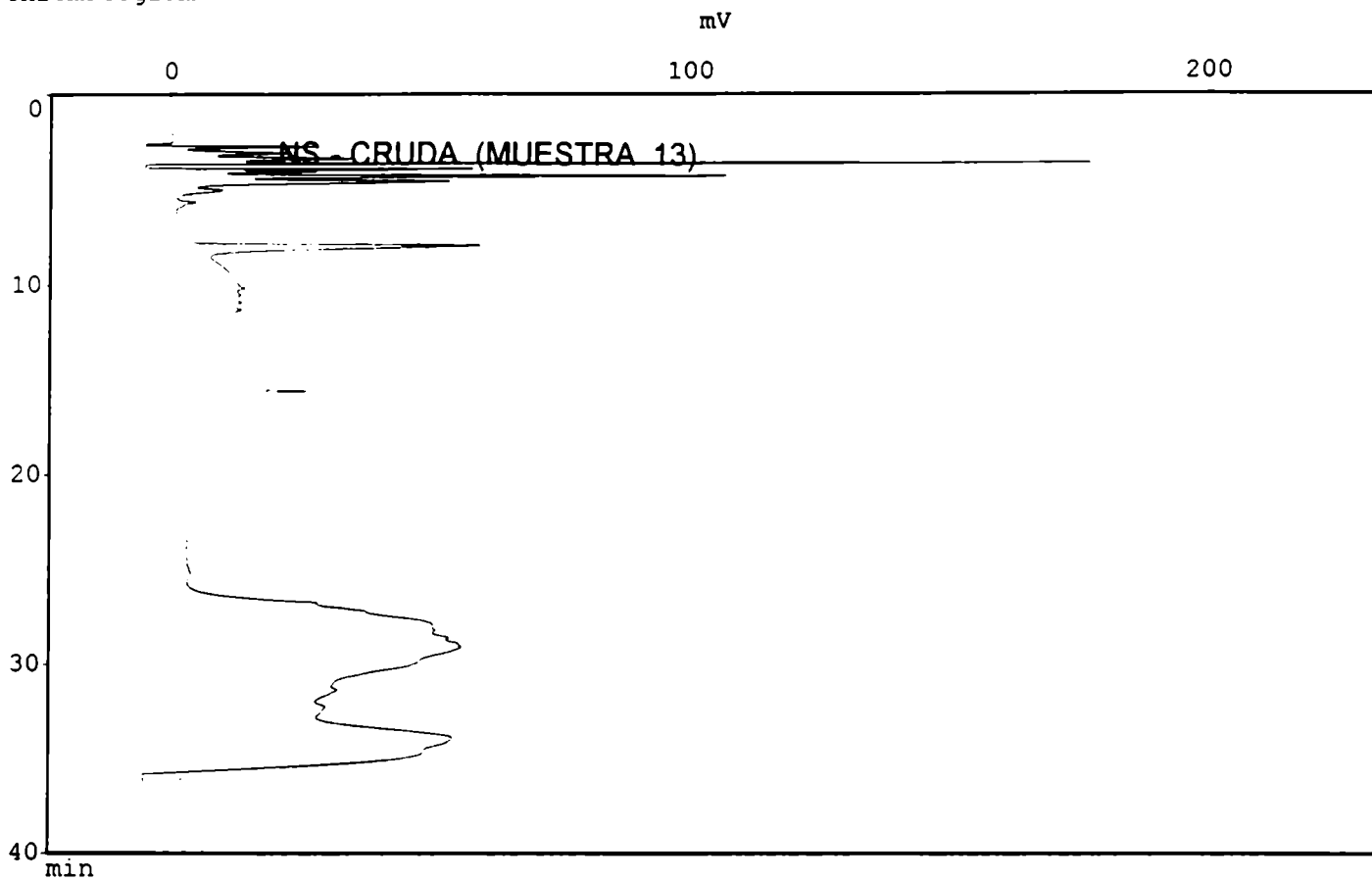
200



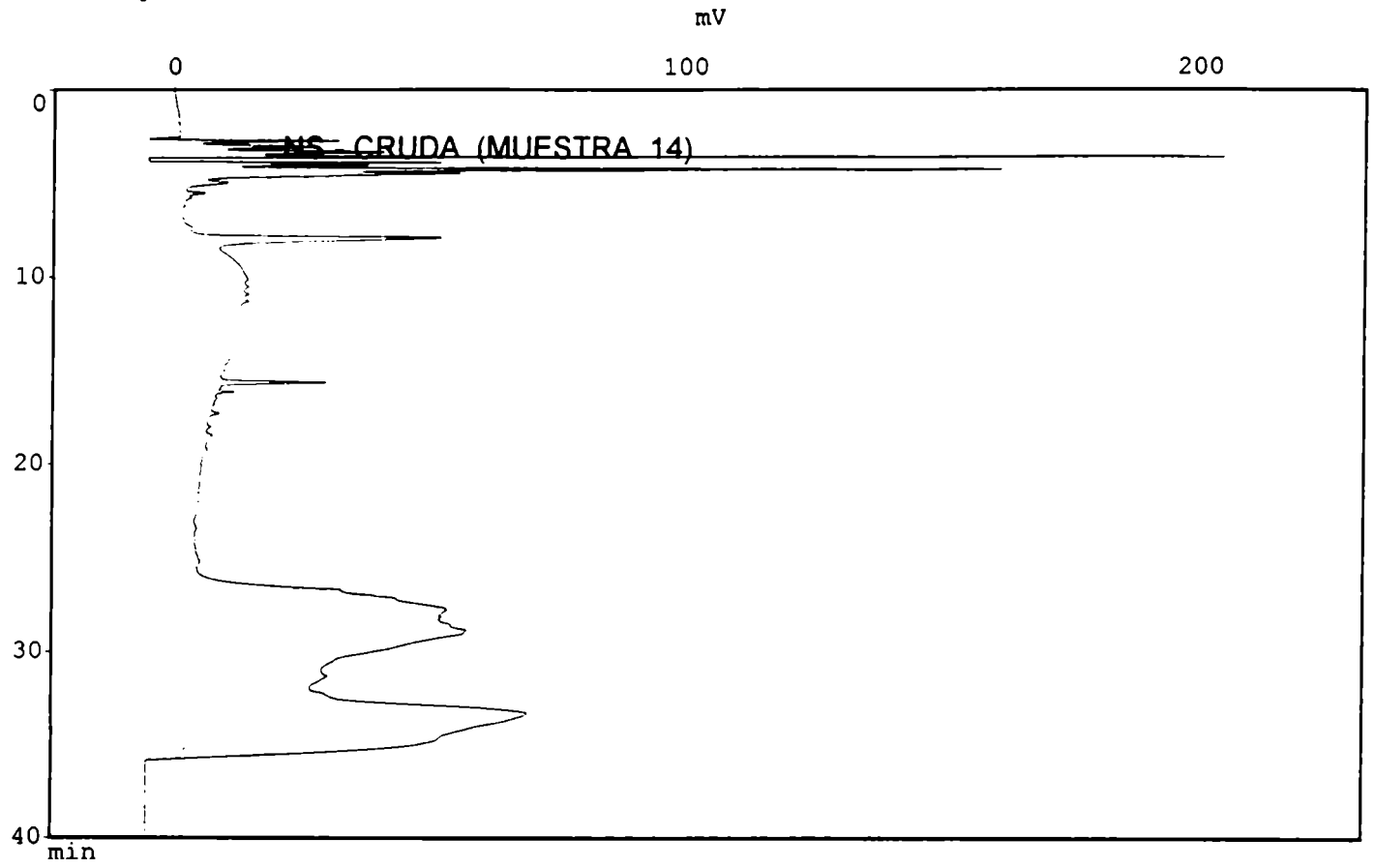
Chromatogram ***



Chromatogram ***

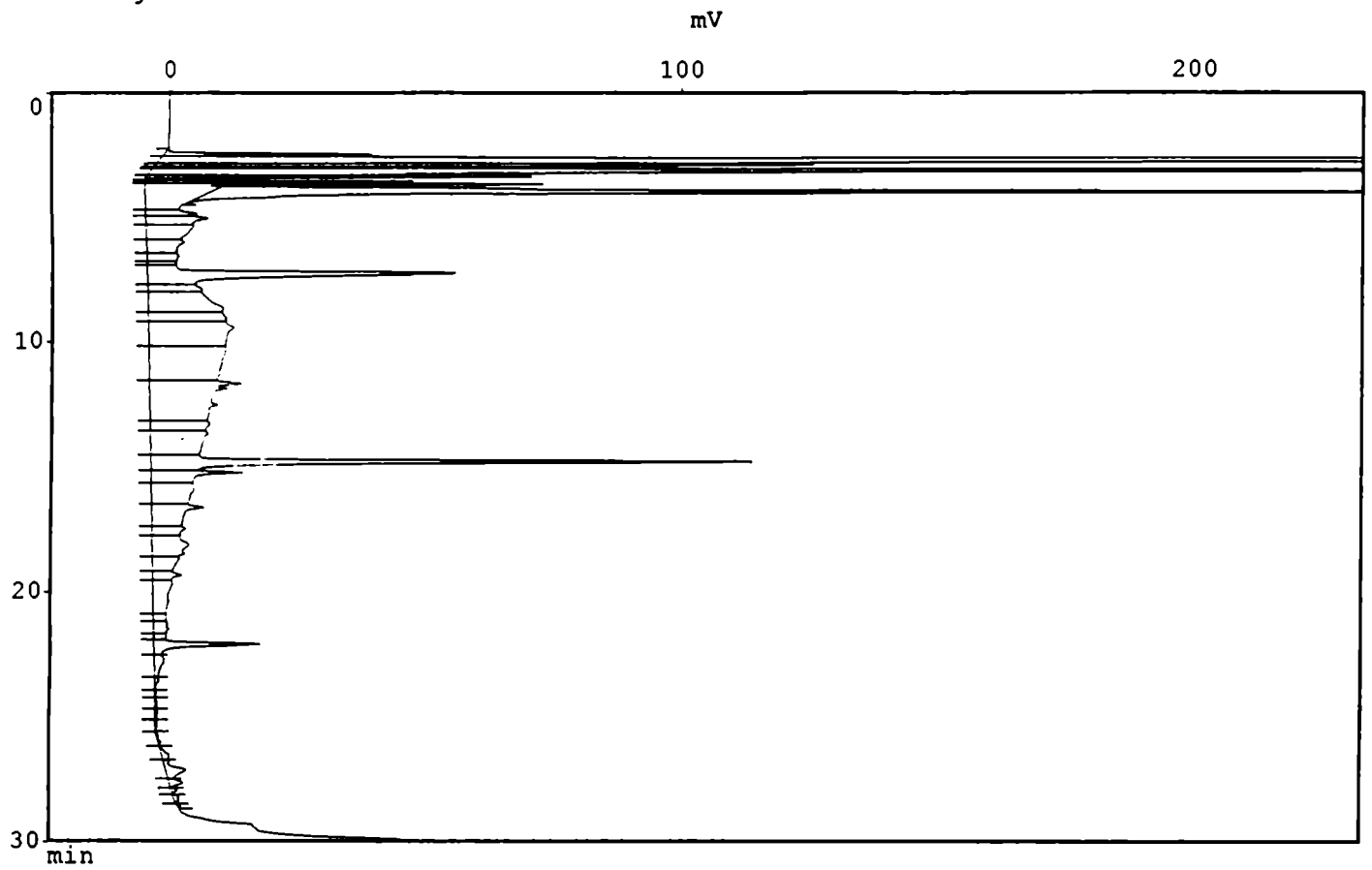


Chromatogram ***



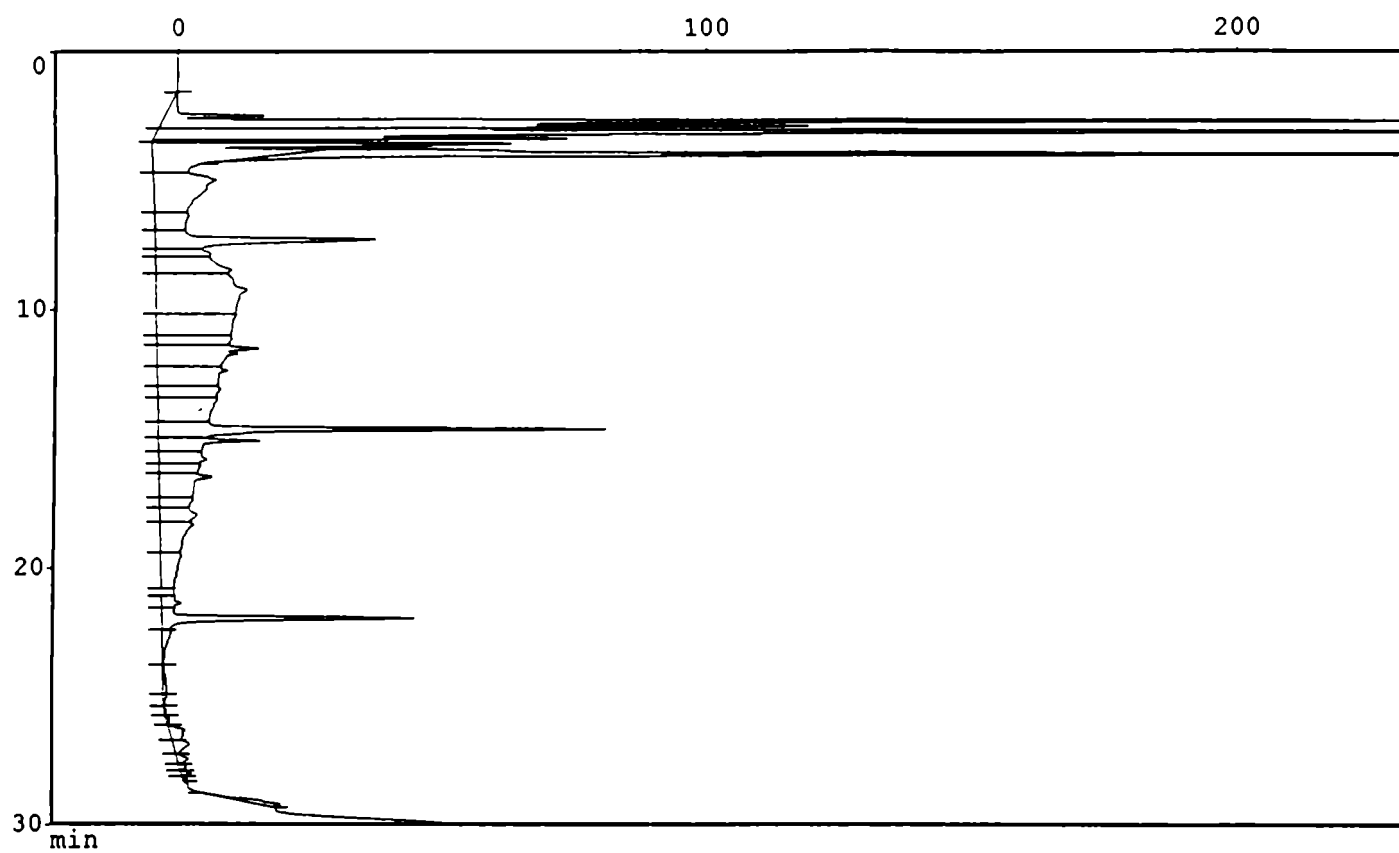
NS - CRUDA BAJO RCS/ML (MUESTRA 23)

Chromatogram ***



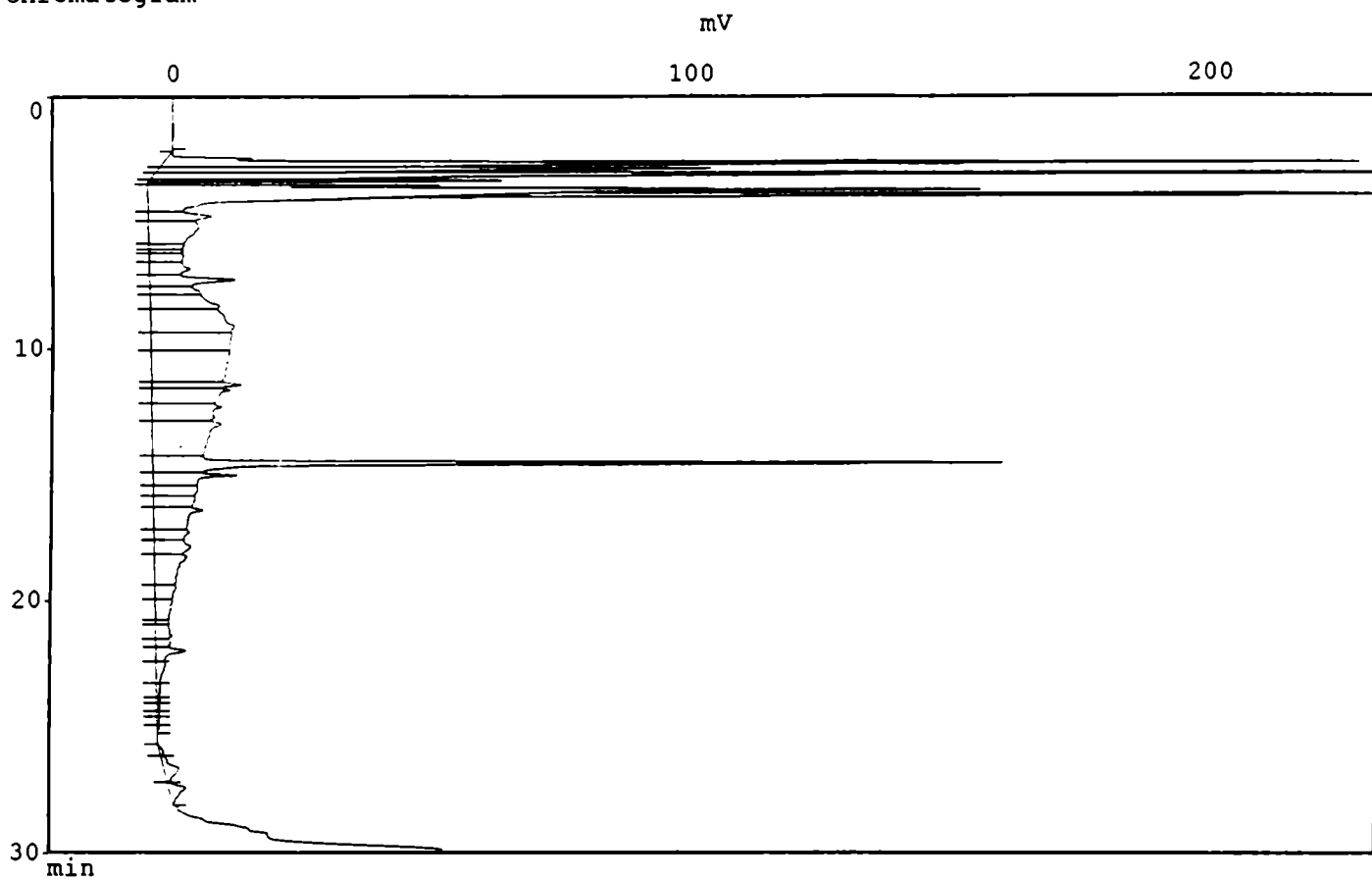
Chromatogram ***

NS - CRUDA BAJO RCS/ML (MUESTRA 24)



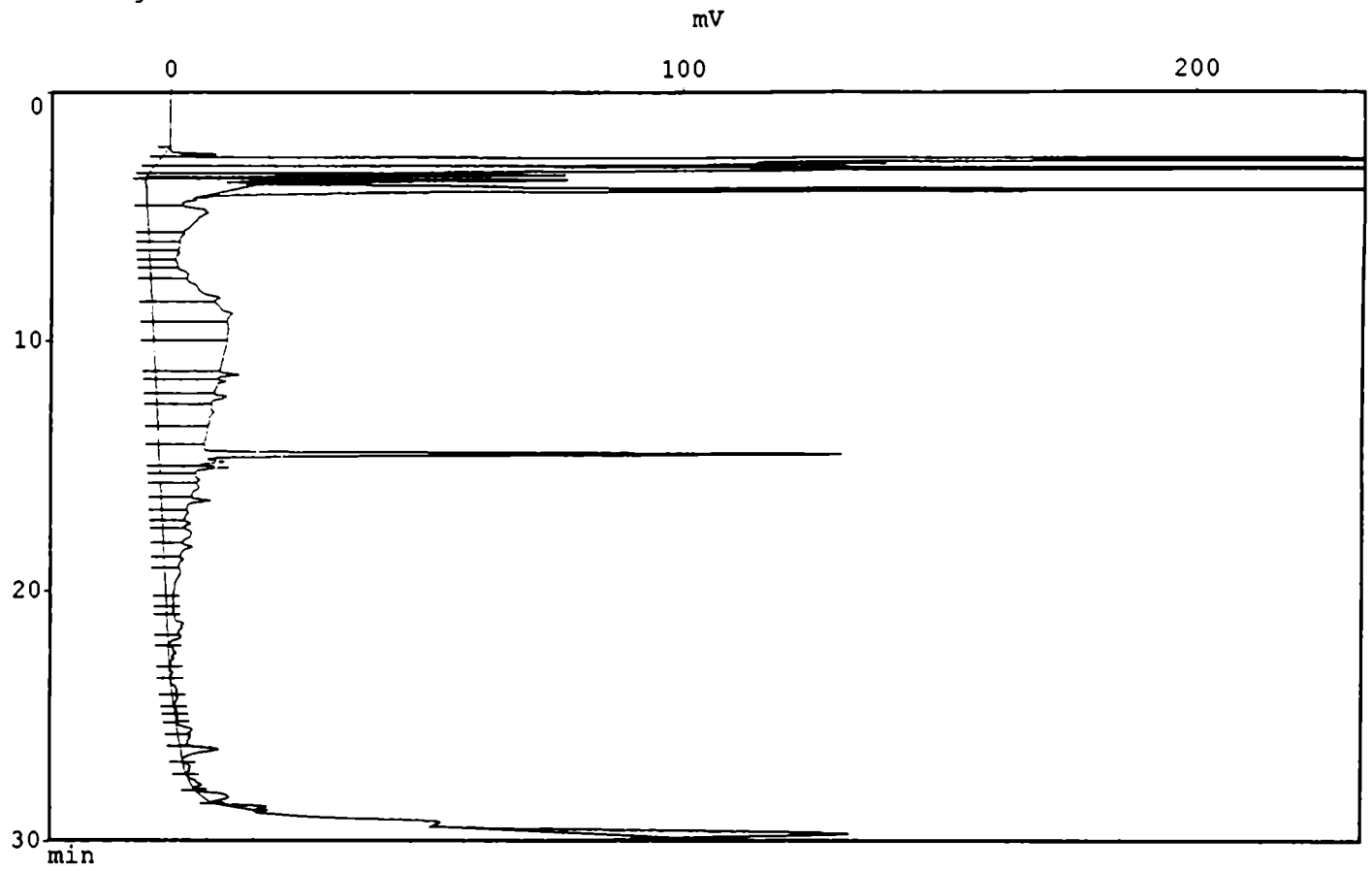
NS - CRUDA BAJO RCS/ML (MUESTRA 25)

*** Chromatogram ***



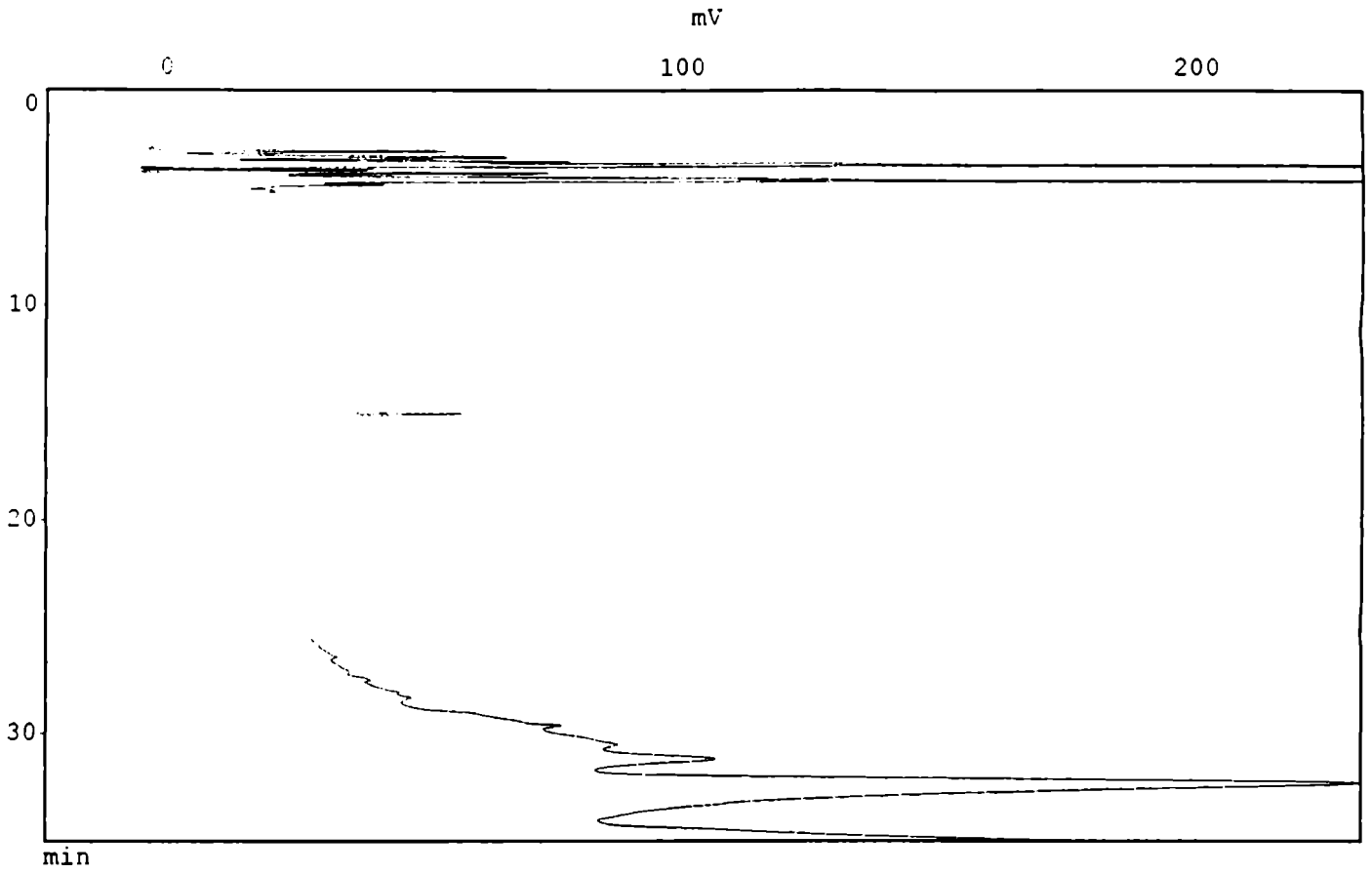
NS - CRUDA BAJO RCS/ML (MUESTRA 34)

Chromatogram ***



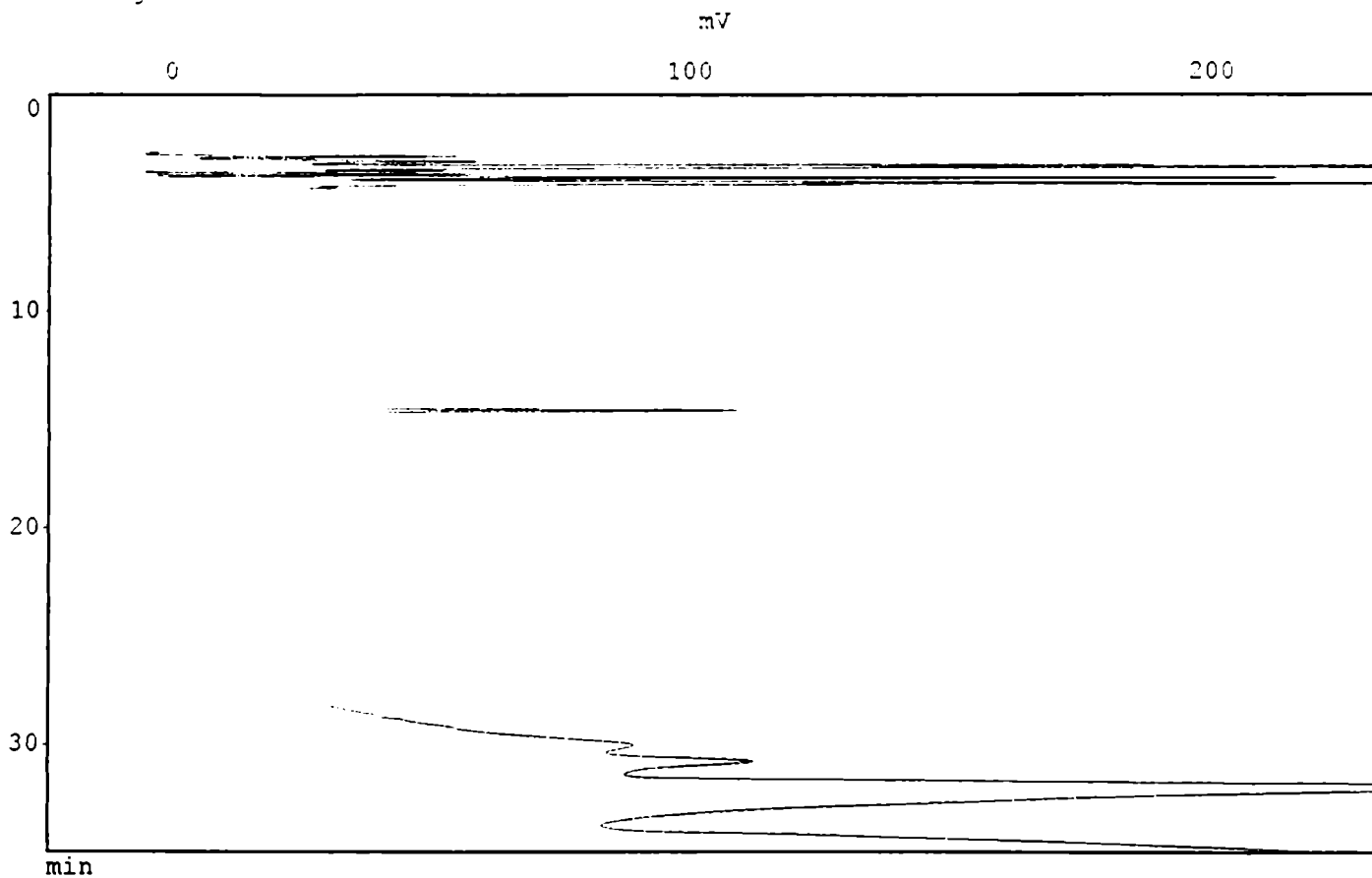
NS - CRUDA - 0 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 37)

*** Chromatogram ***



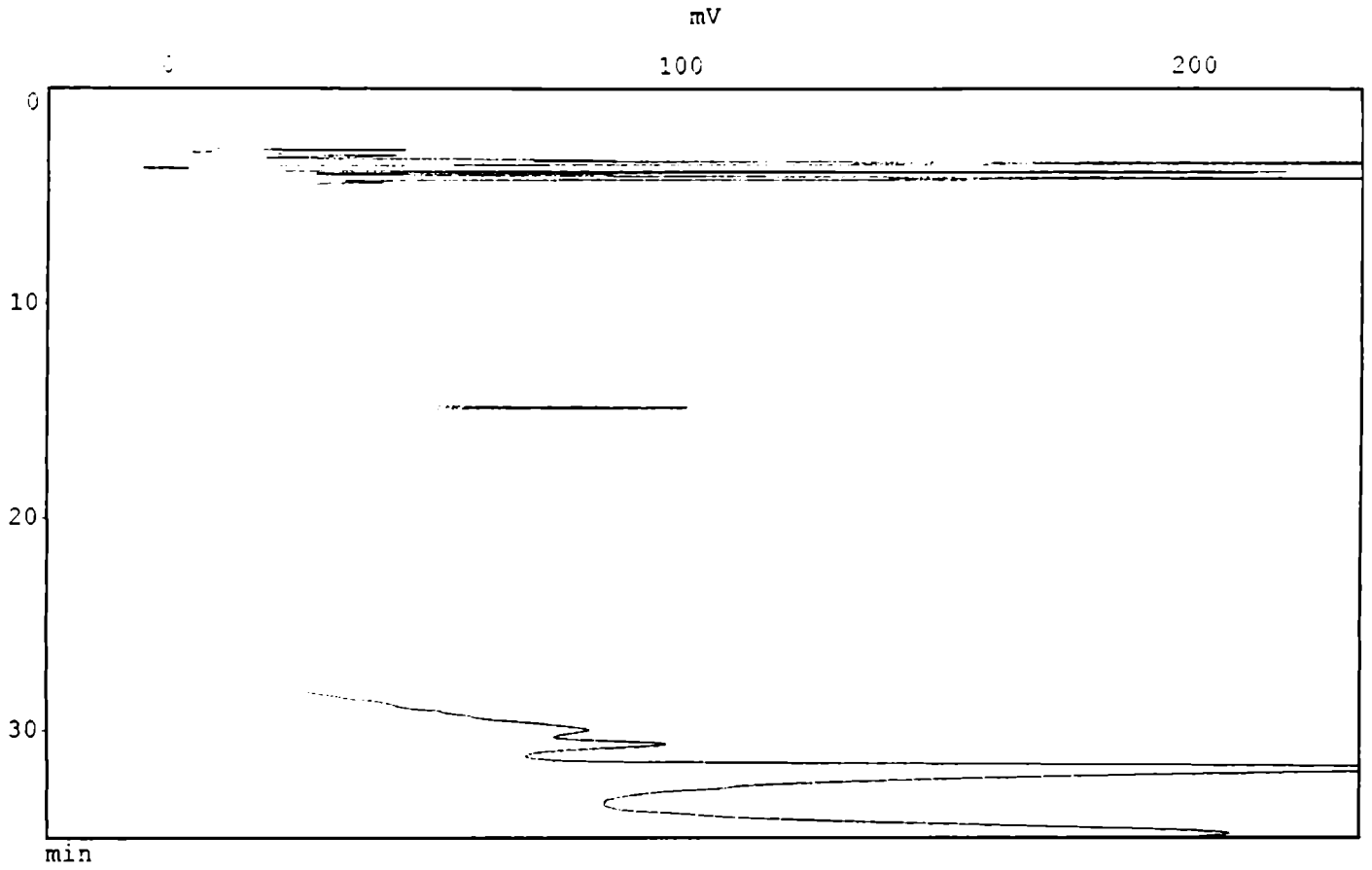
NS - CRUDA - 0 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 38)

*** Chromatogram ***

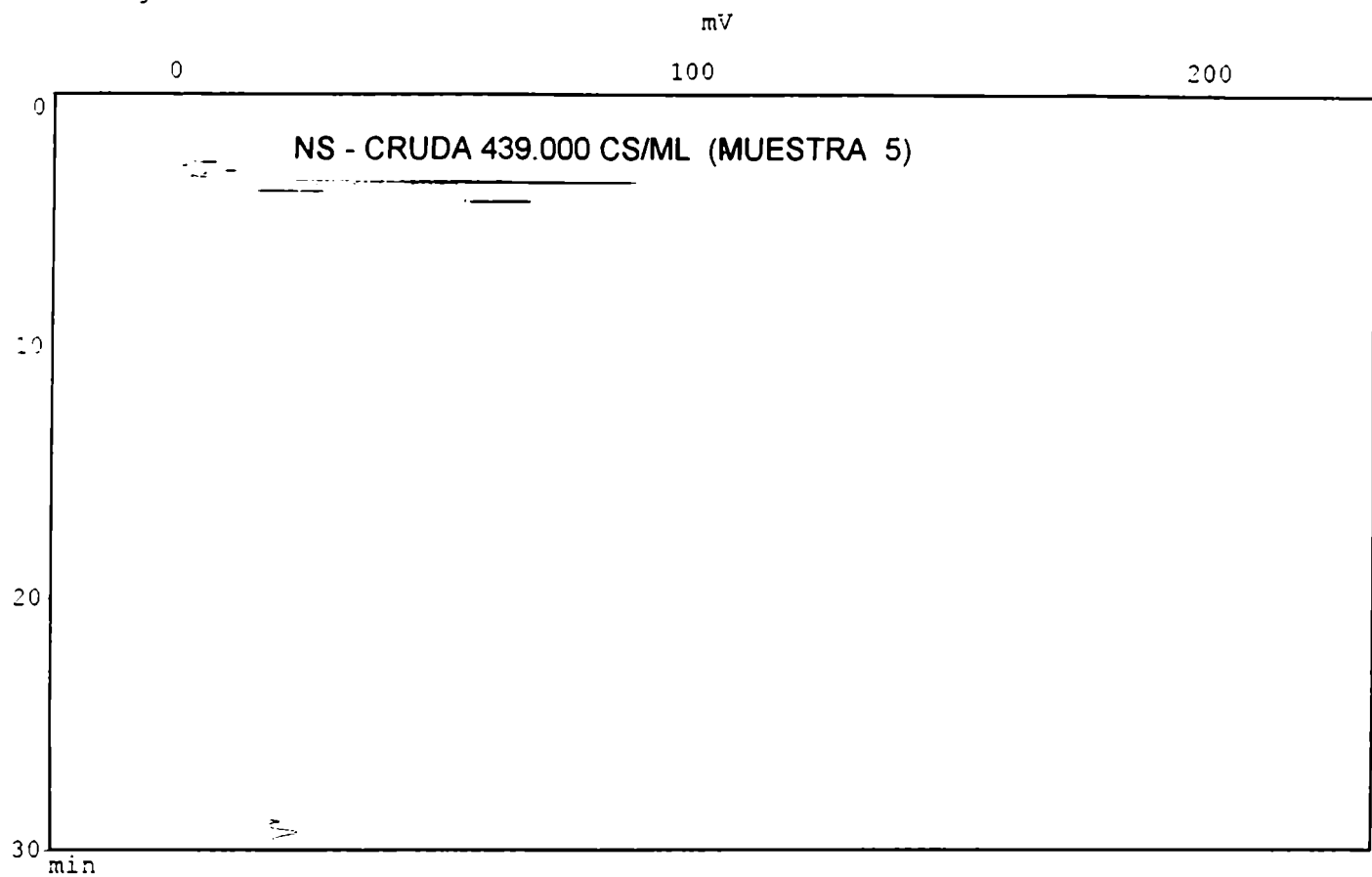


NS - CRUDA - 0 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 39)

*** Chromatogram ***



Chromatogram ***



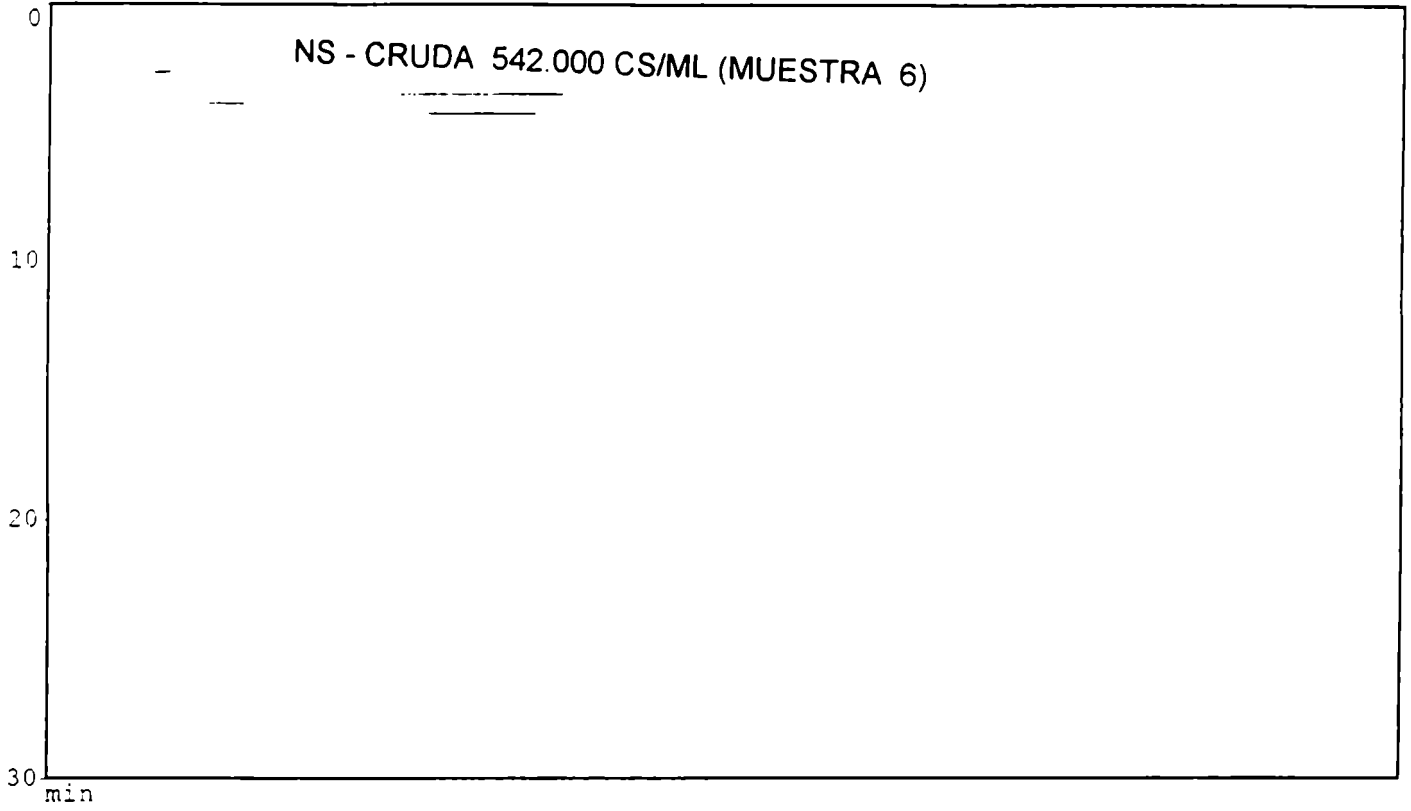
** Chromatogram **

mV

0

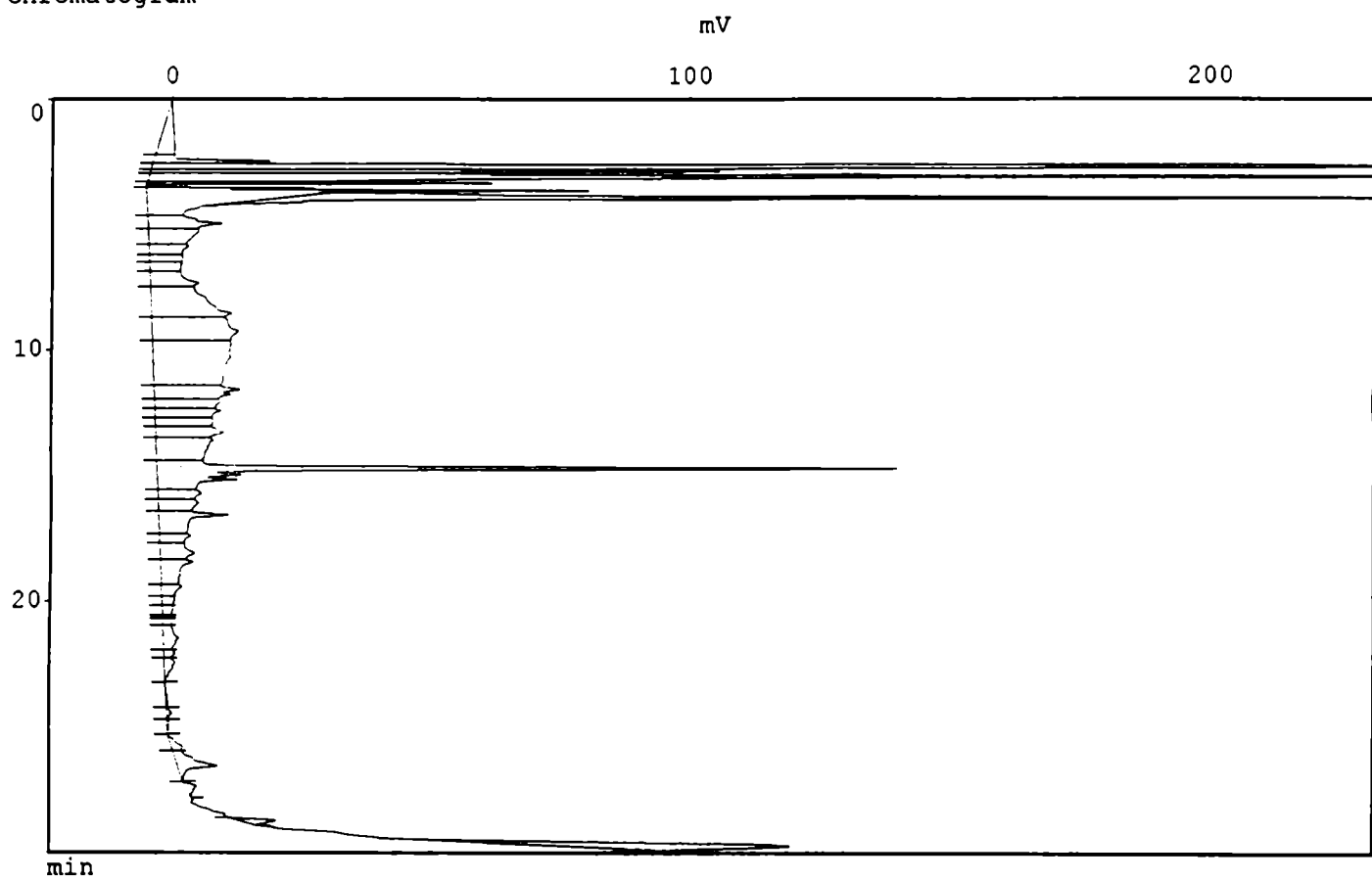
100

200



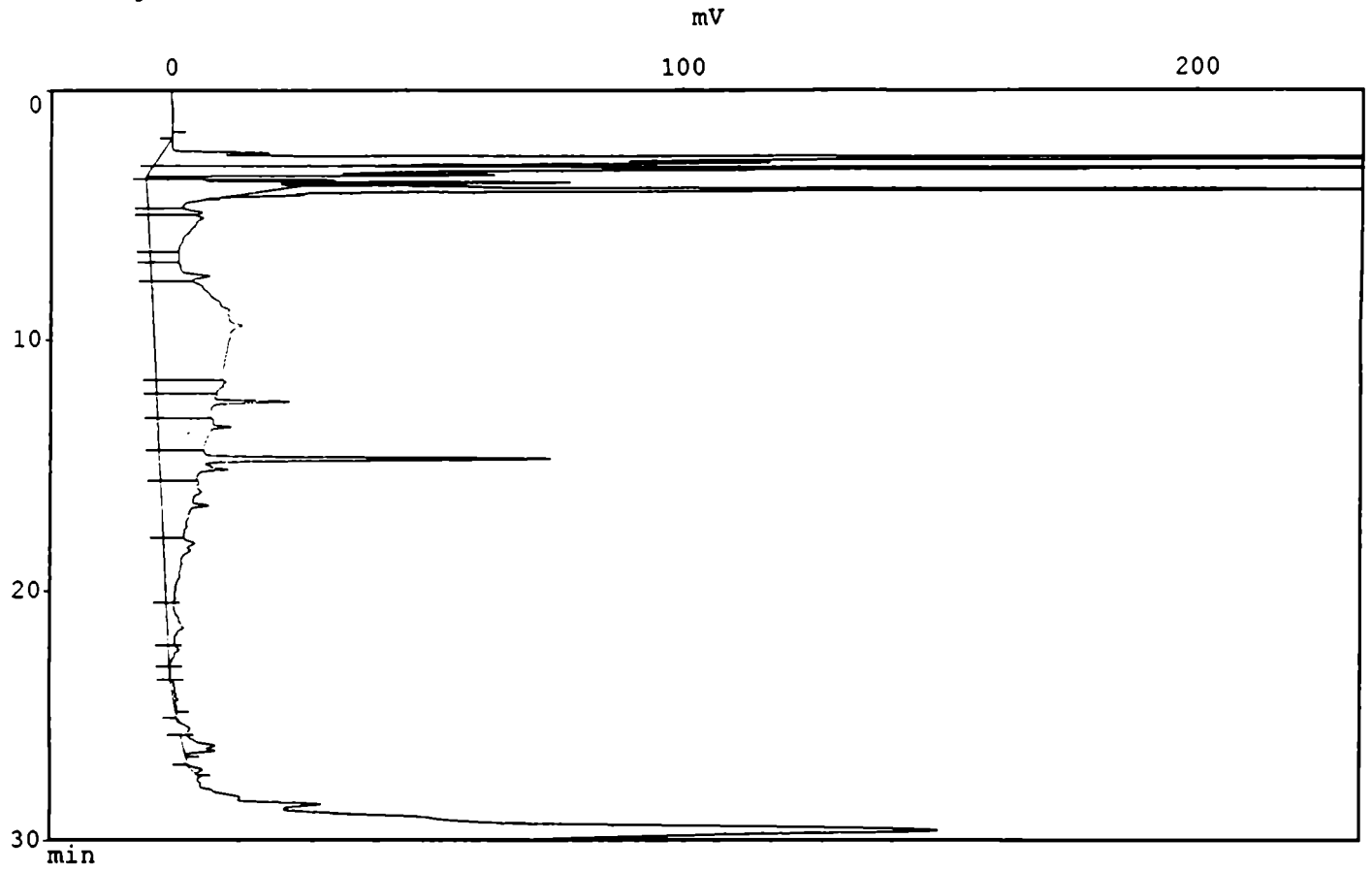
NS - CRUDA 534.000 CS/ML (MUESTRA 26)

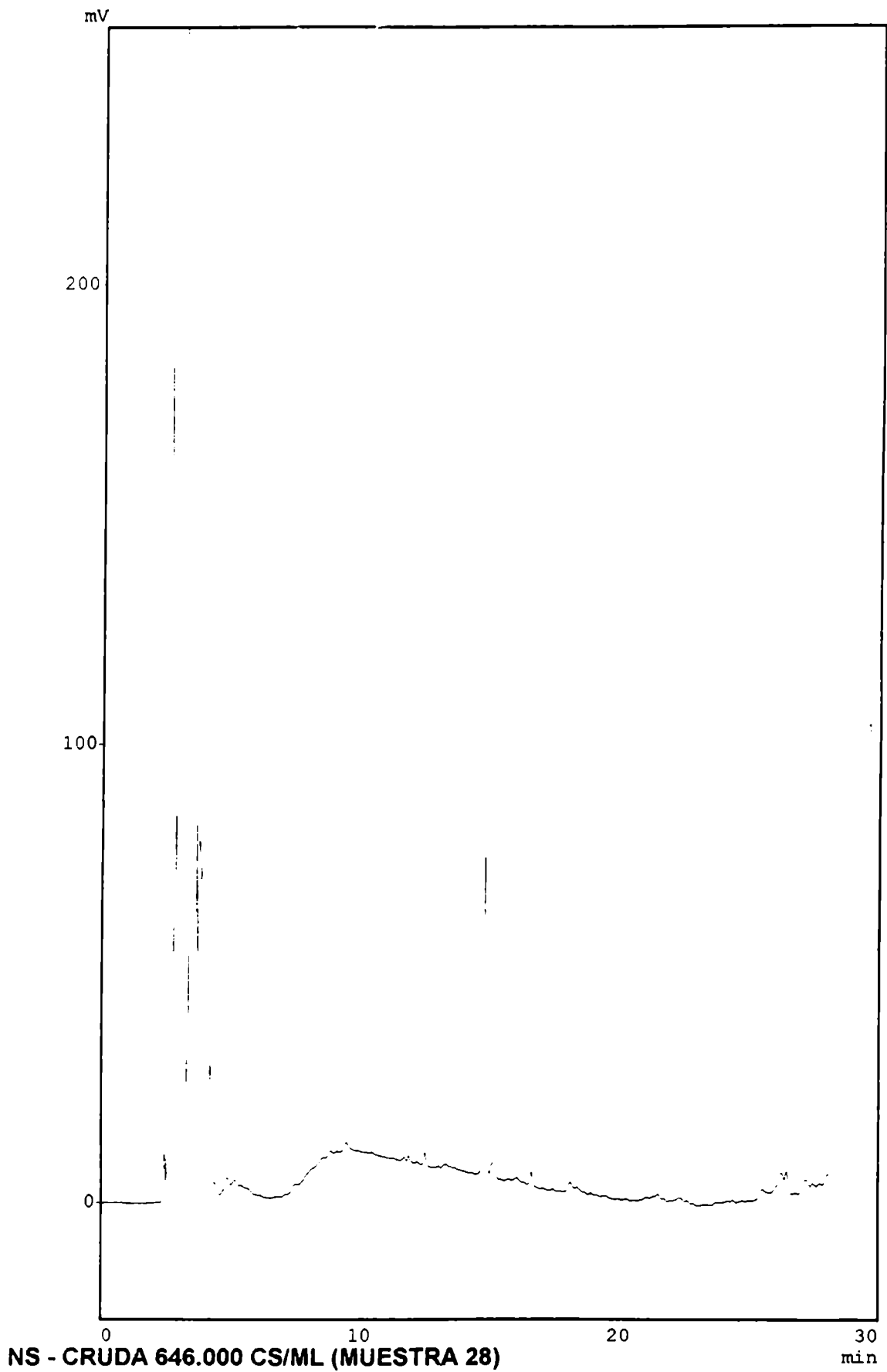
*** Chromatogram ***



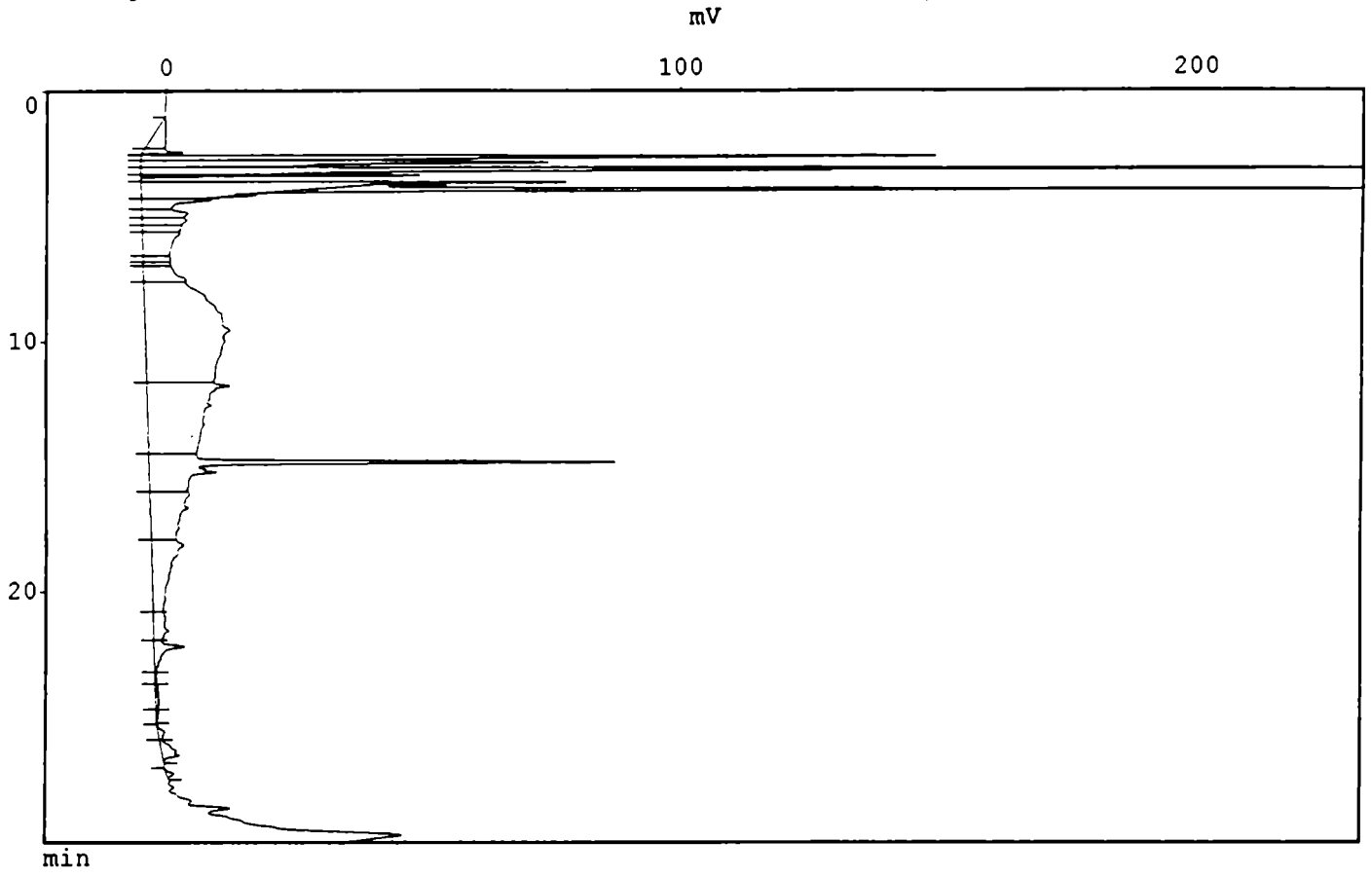
NS - CRUDA 615.000 CS/ML (MUESTRA 27)

Chromatogram ***



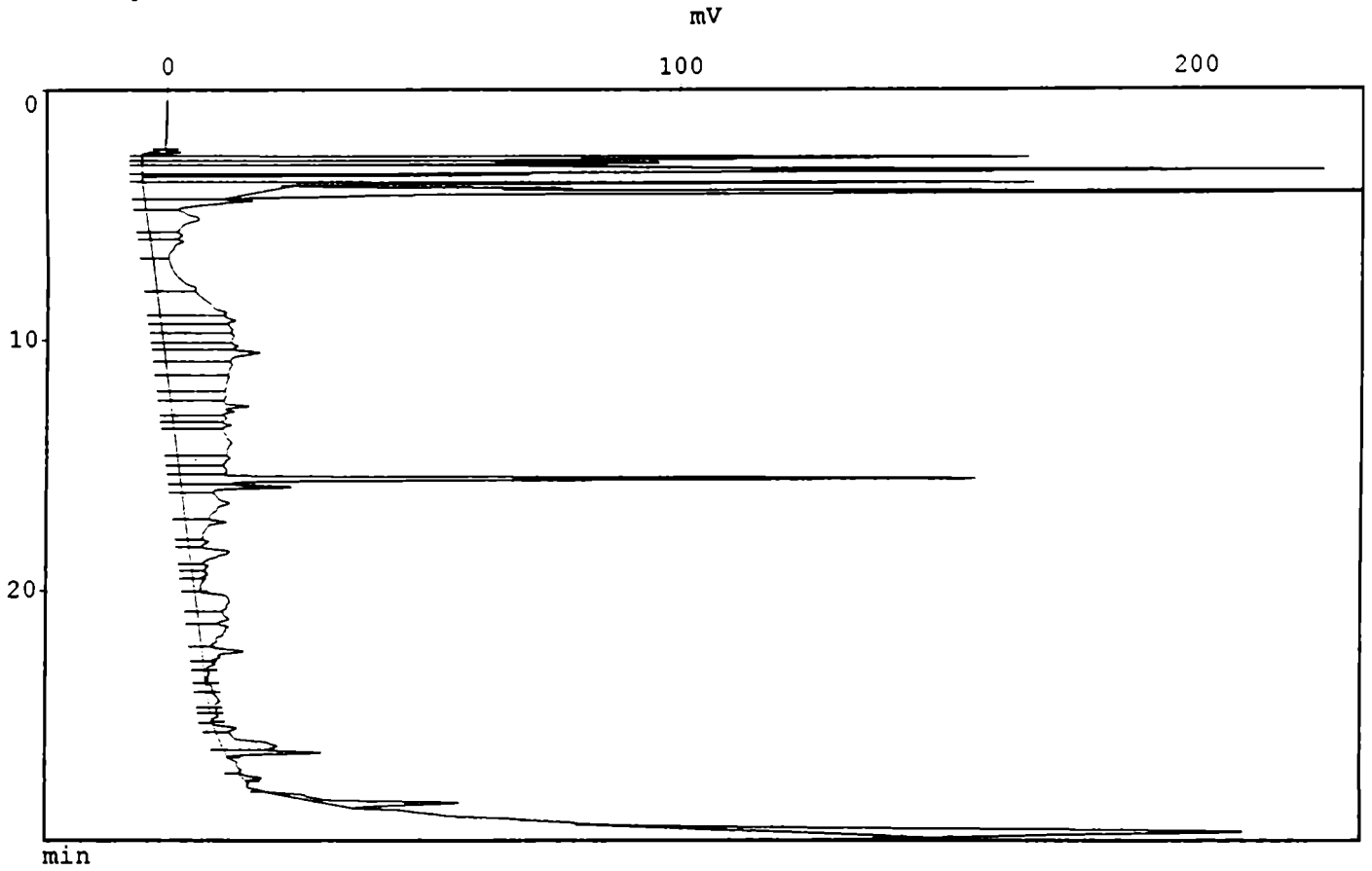


** Chromatogram *** NS - CRUDA 662.000 CS/ML (MUESTRA 29)



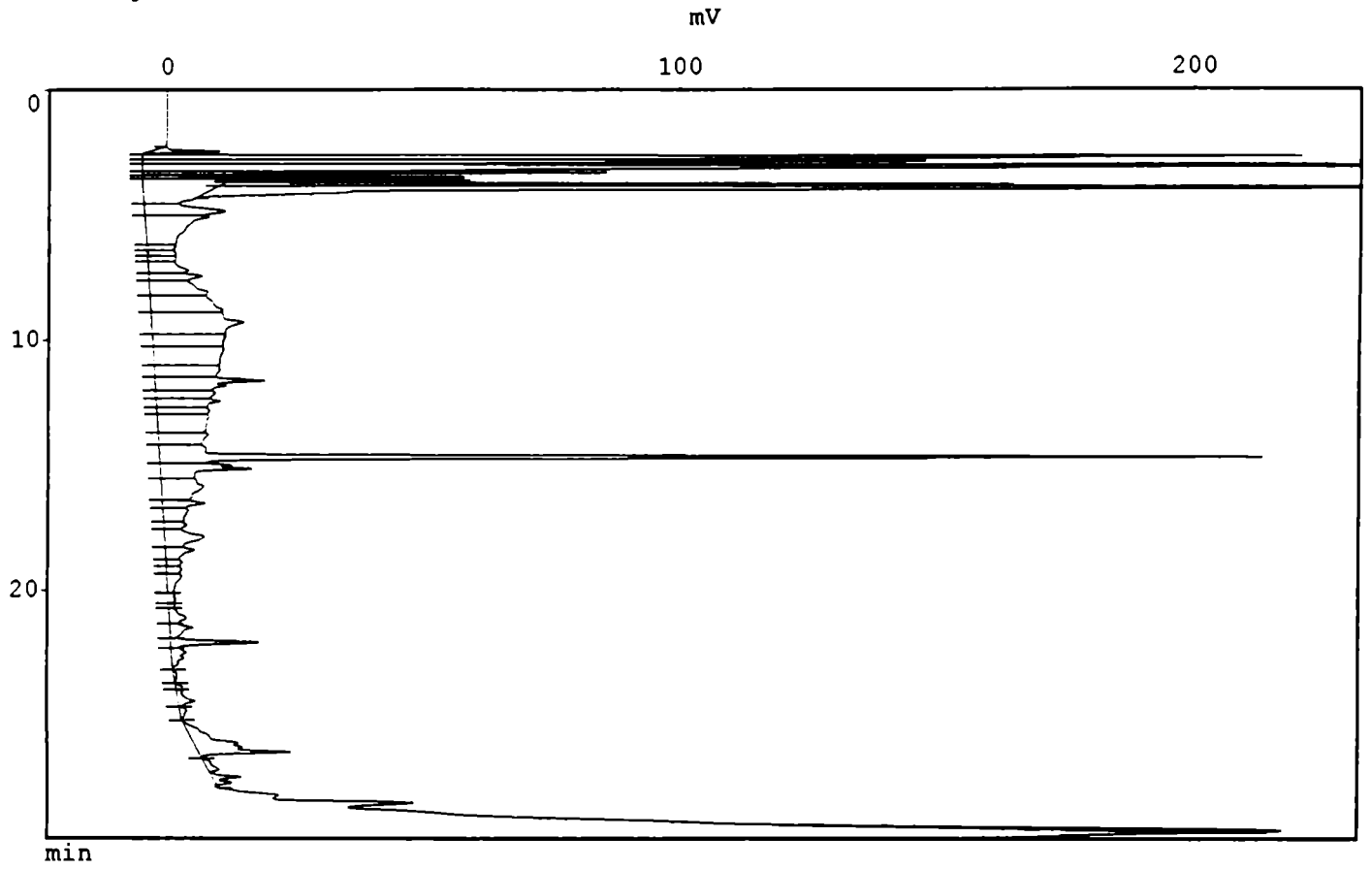
NS - CRUDA 1.143.000 CS/ML (MUESTRA 30)

*** Chromatogram ***



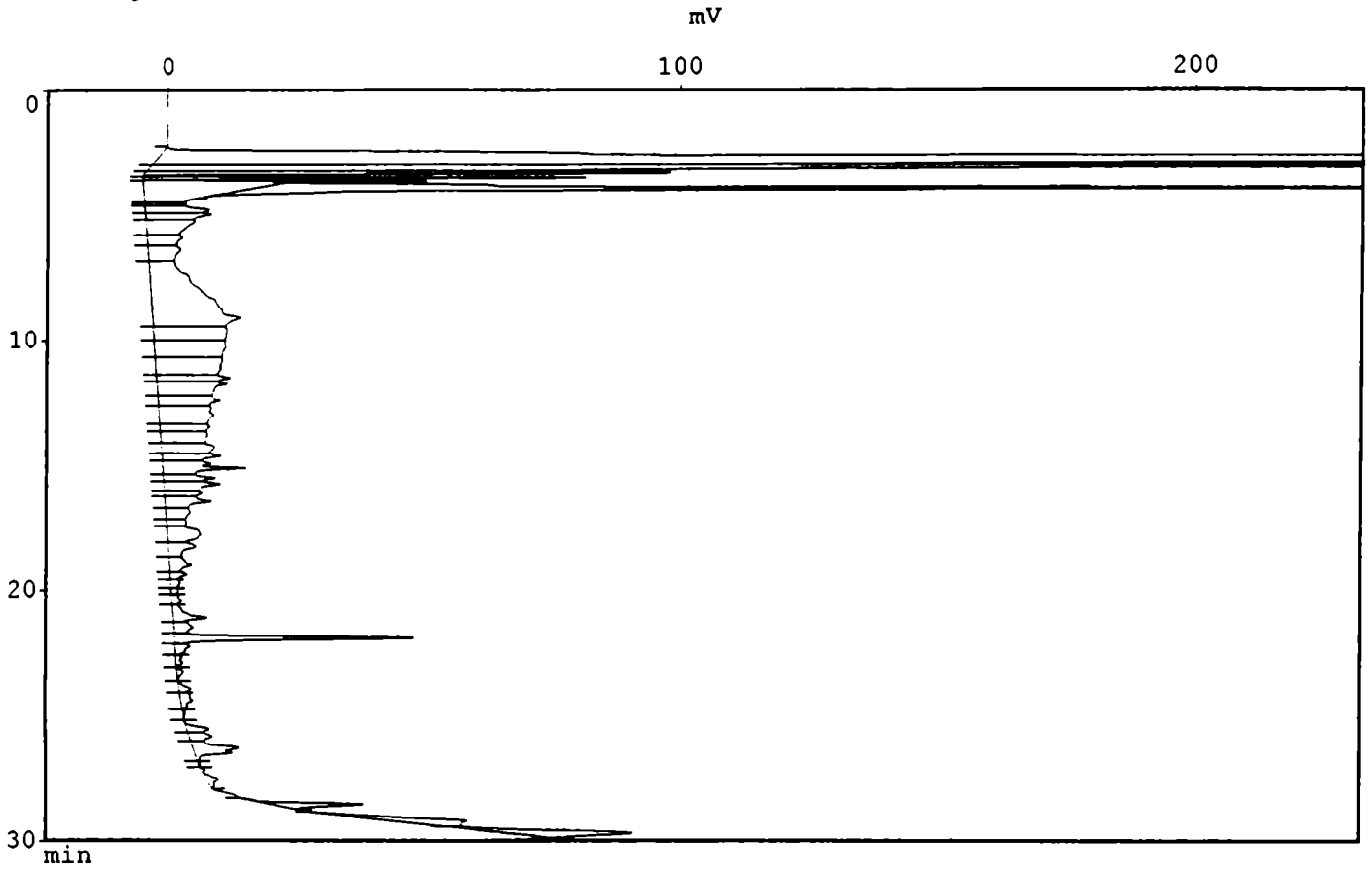
NS - CRUDA 1.000.000 CS/ML (MUESTRA 31)

Chromatogram ***



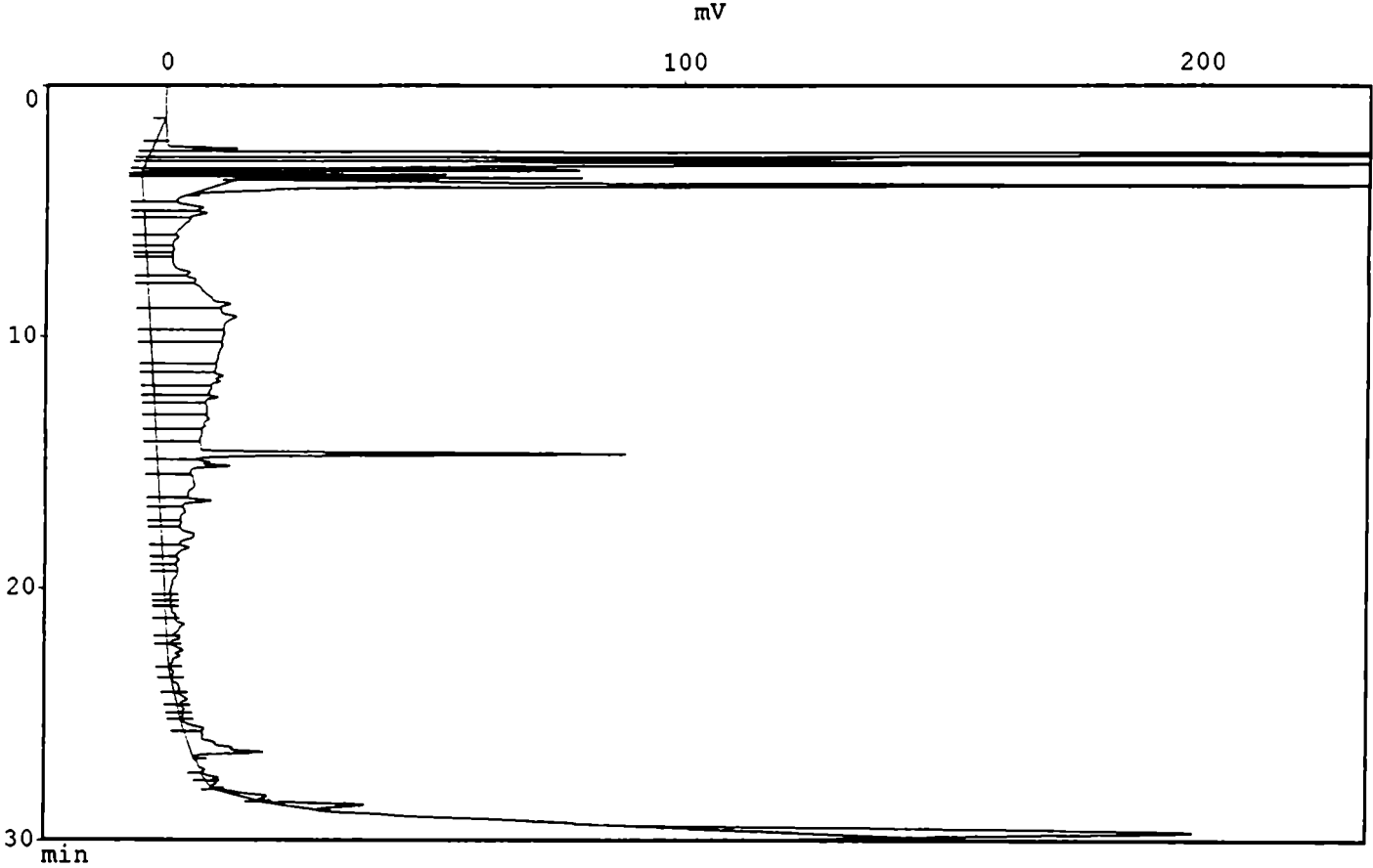
NS - CRUDA 1.000.000 CS/ML (MUESTRA 32)

*** Chromatogram ***



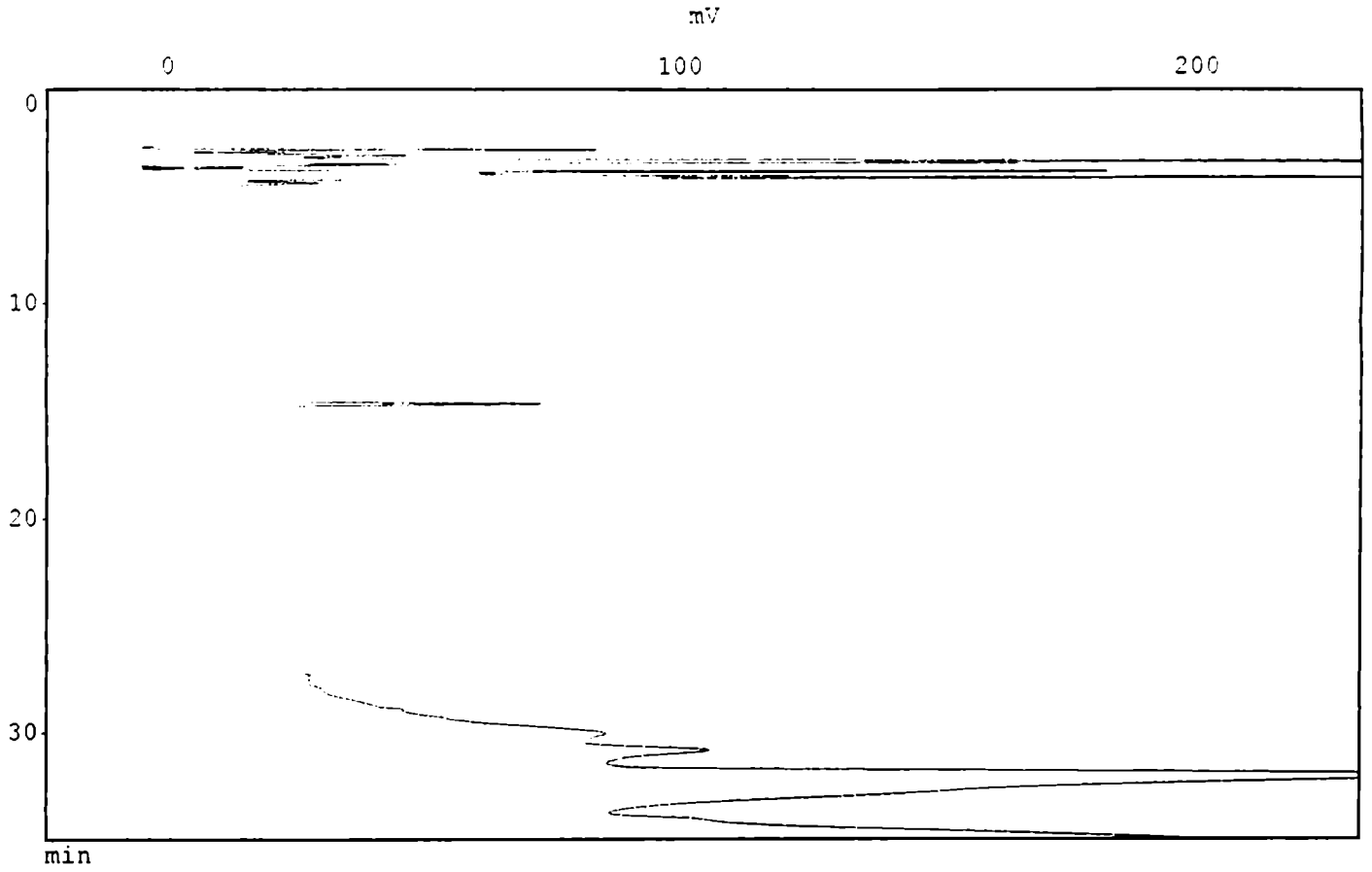
NS - CRUDA 1.722.000 CS/ML (MUESTRA 33)

Chromatogram ***



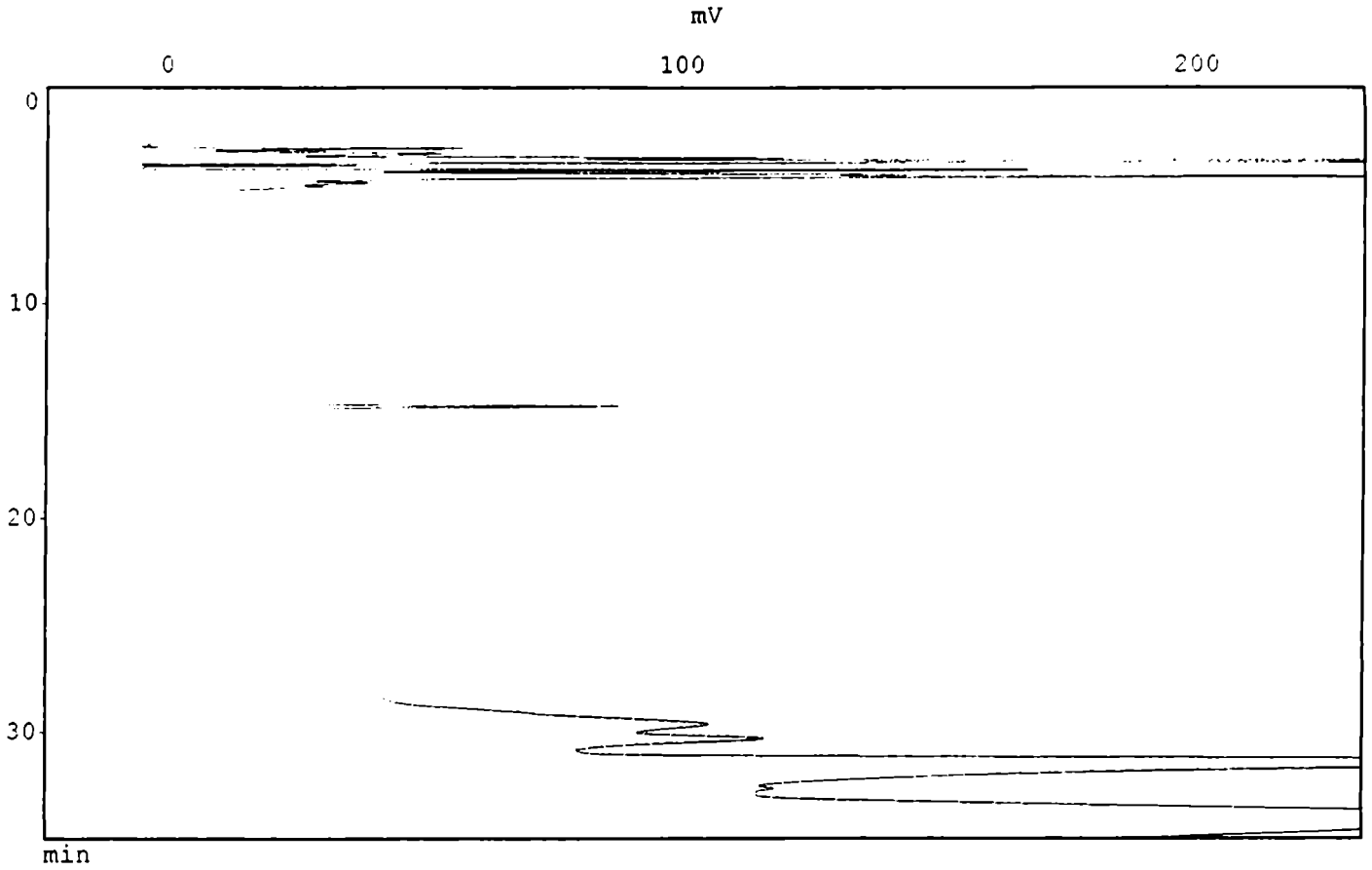
NS - CRUDA - 0 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 40)

Chromatogram ***

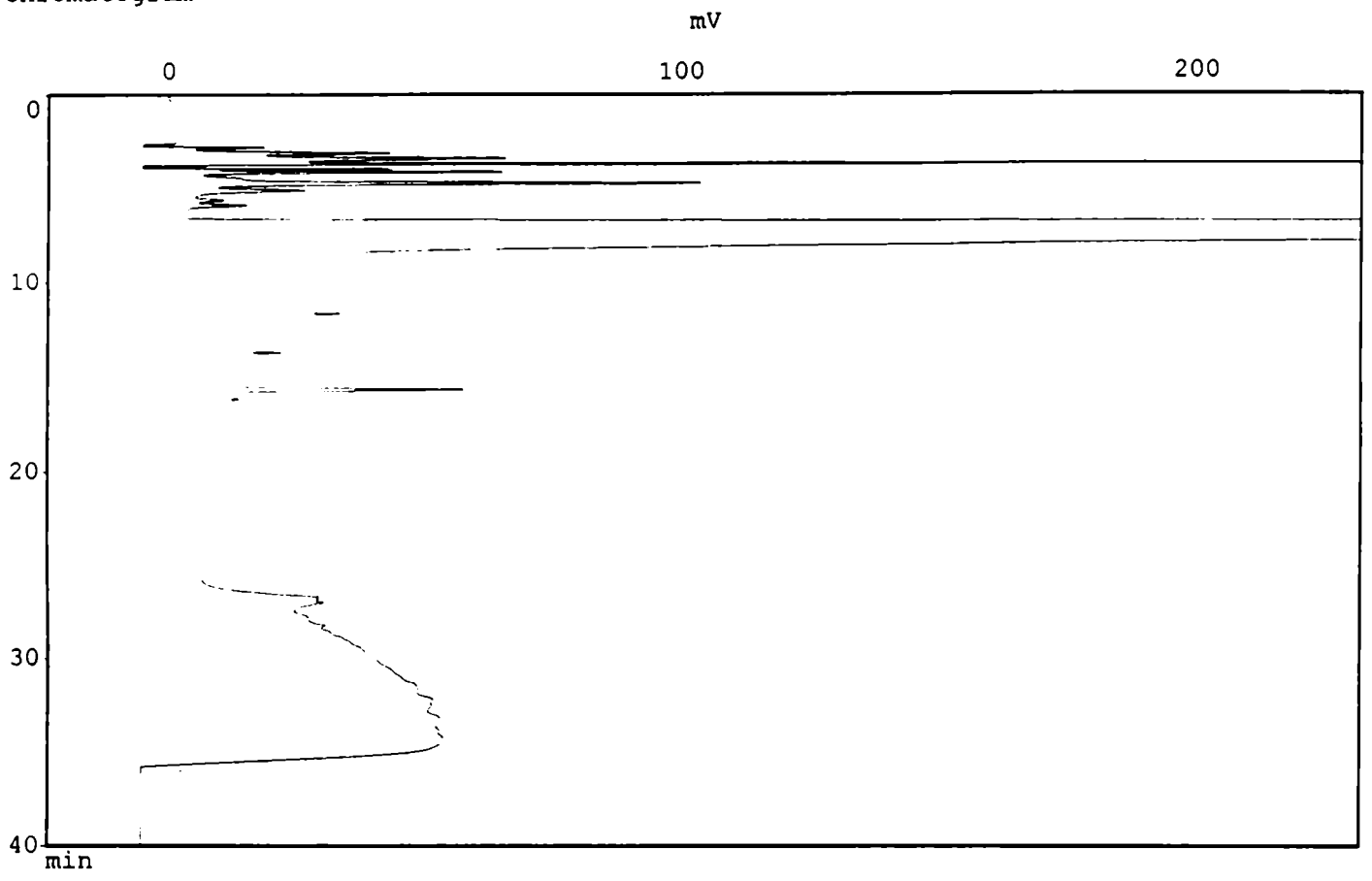


NS - CRUDA - 0 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 41)

*** Chromatogram ***

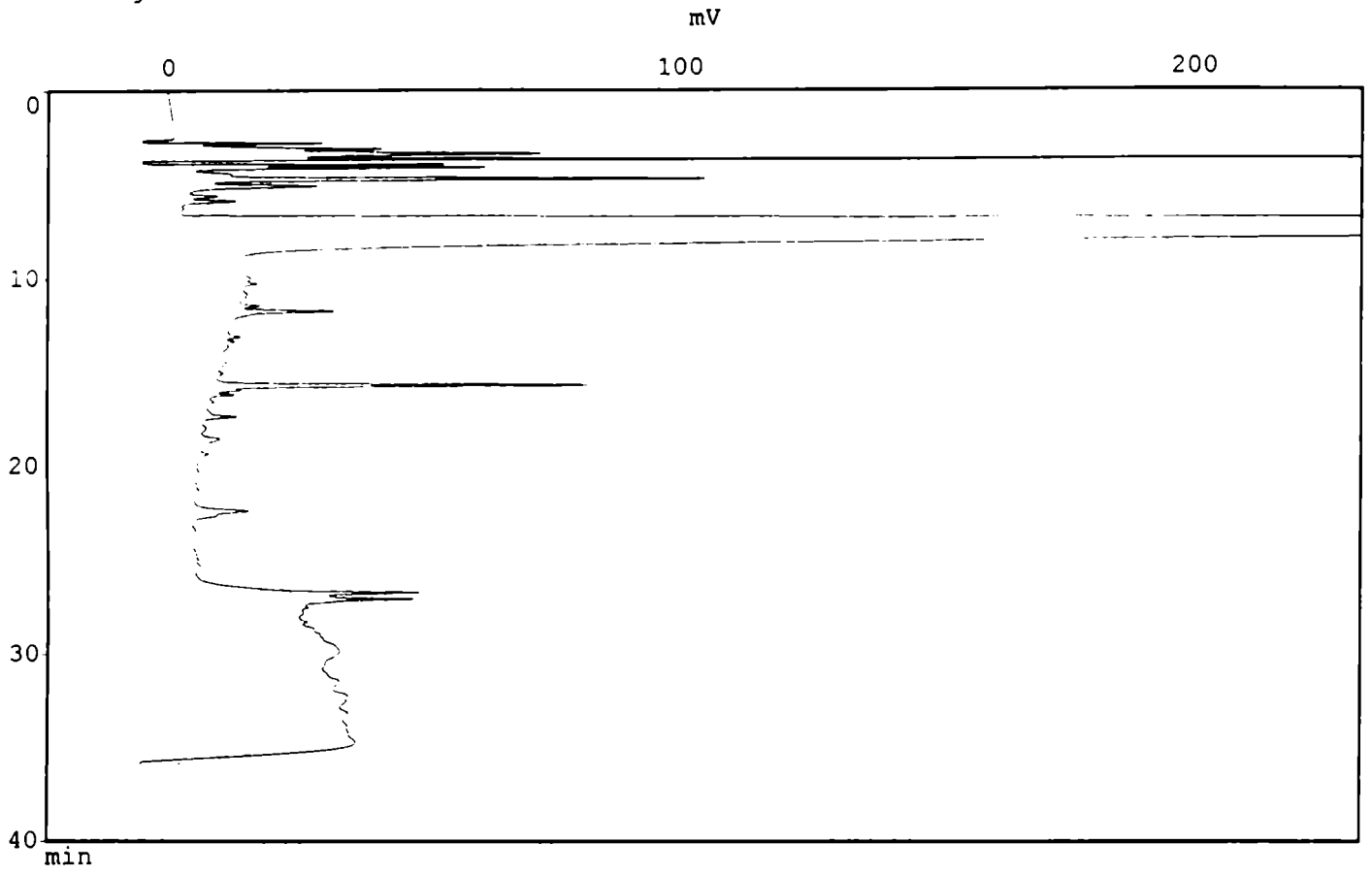


Chromatogram ***



NNP - CRUDA 200.000 CS/ML (MUESTRA 7)

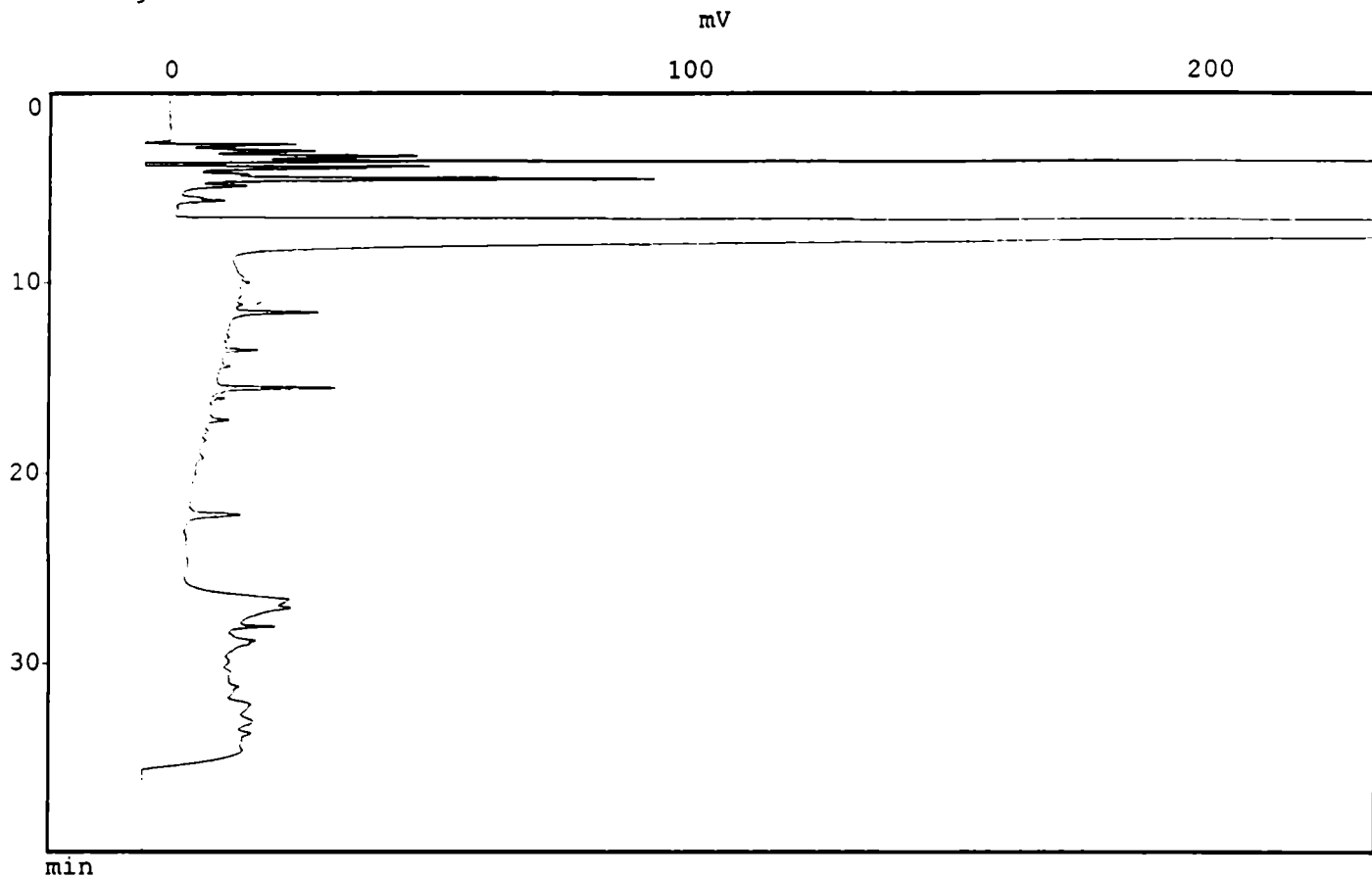
*** Chromatogram ***



NNP - CRUDA

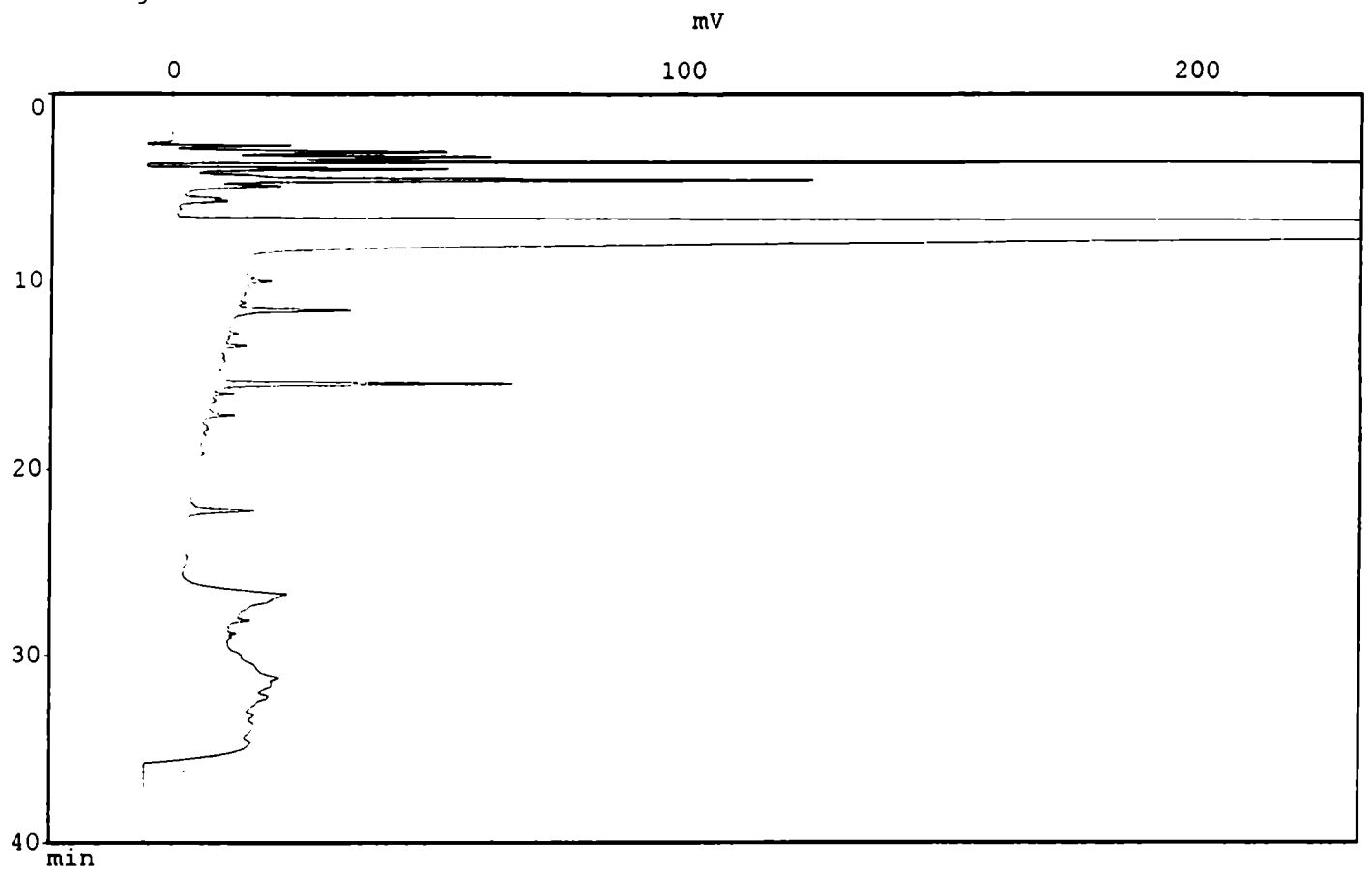
(MUESTRA 8)

Chromatogram ***



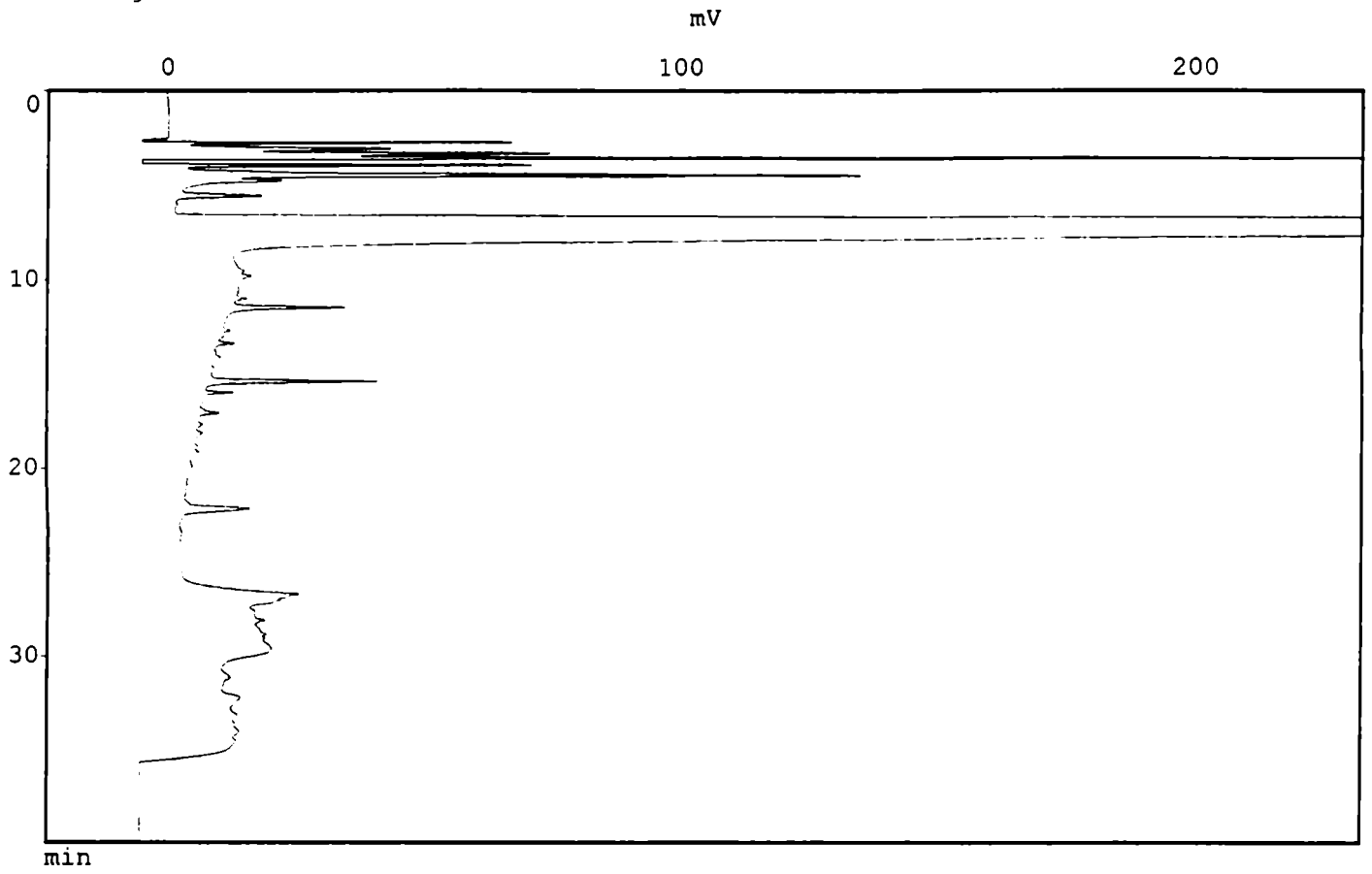
NNP - CRUDA (MUESTRA 11)

Chromatogram ***



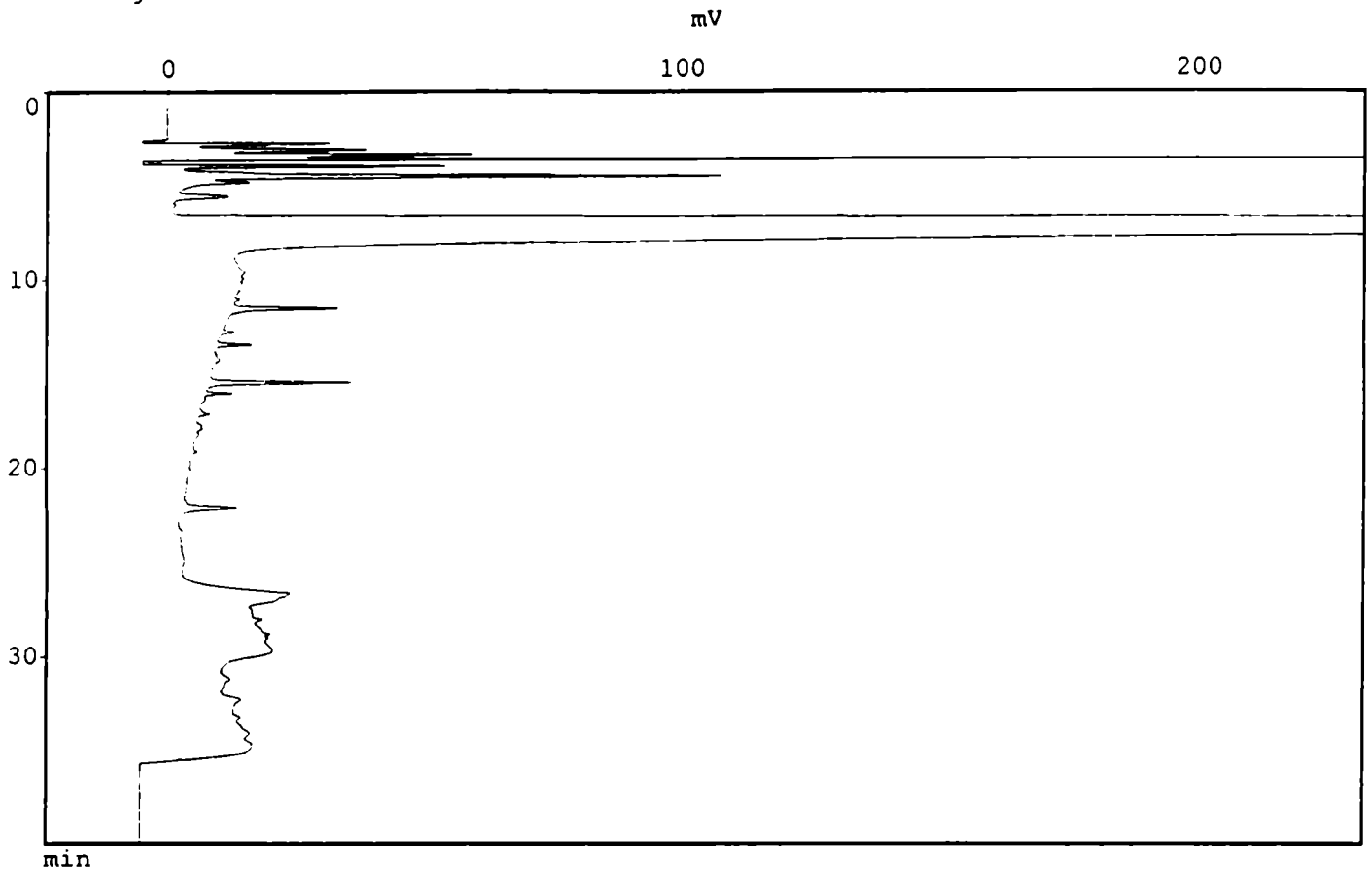
NNP - CRUDA (MUESTRA 12)

Chromatogram ***



NNP - CRUDA (MUESTRA 13)

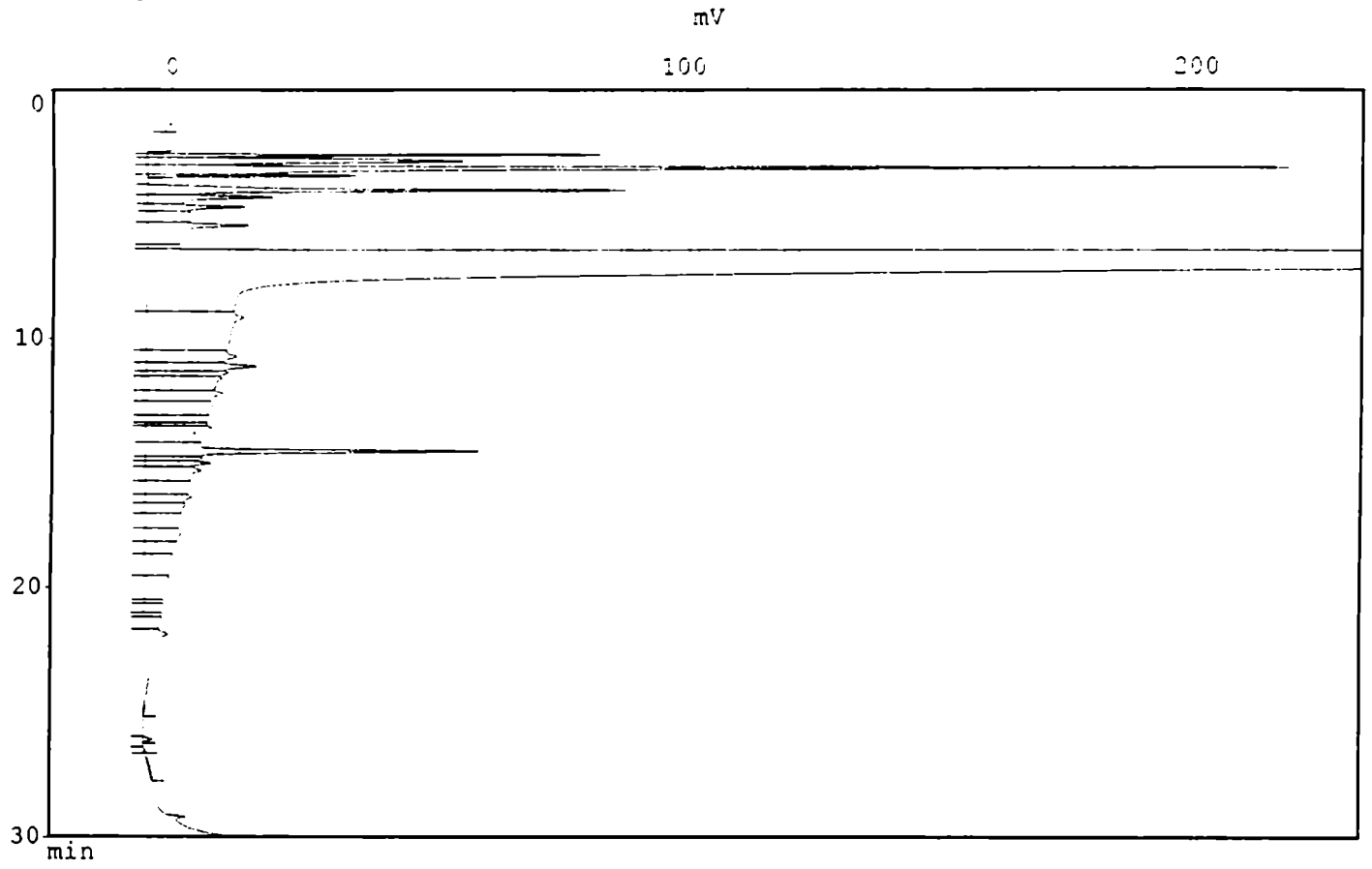
Chromatogram ***



NNP - CRUDA (MUESTRA 14)

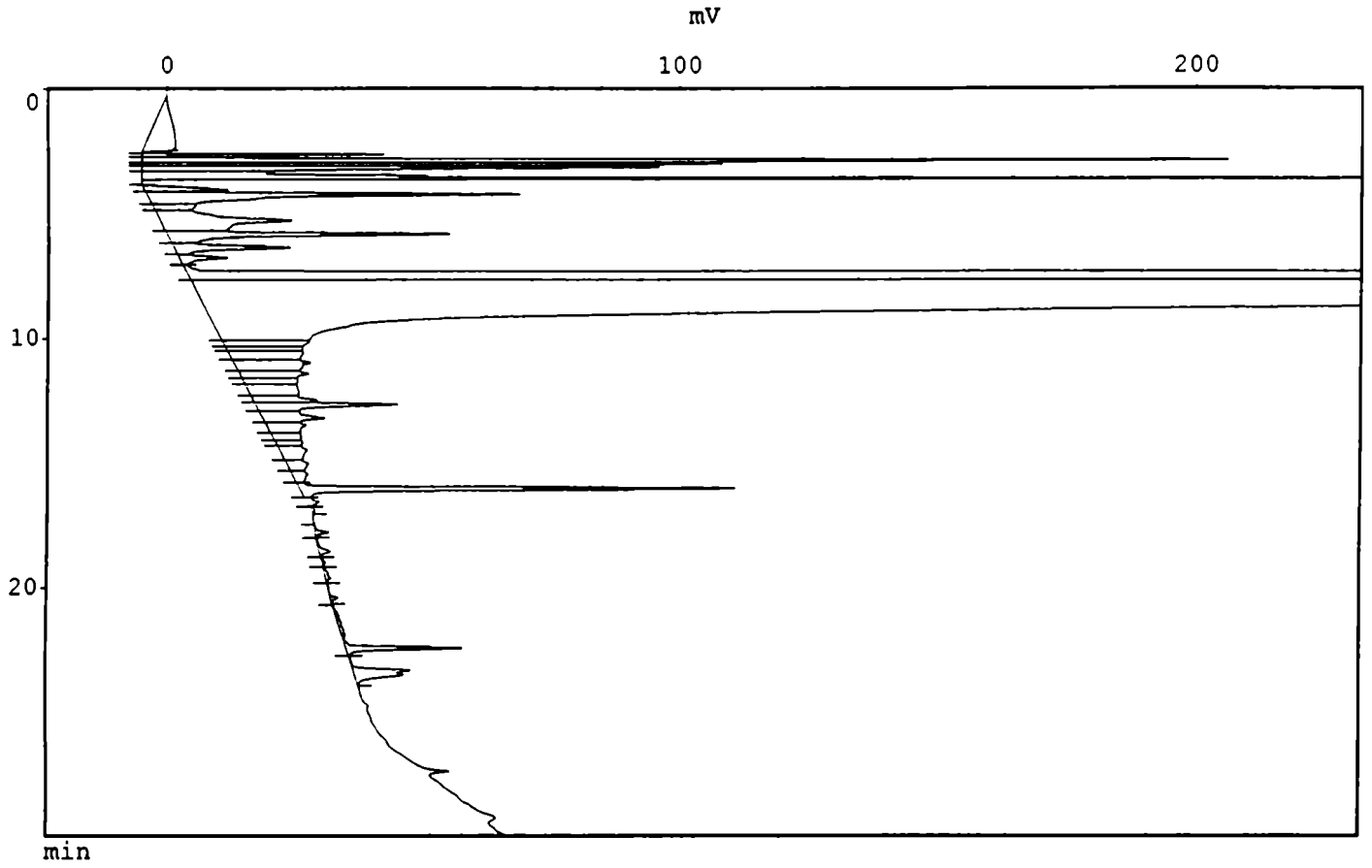
NNP - CRUDA (MUESTRA 21)

Chromatogram ***



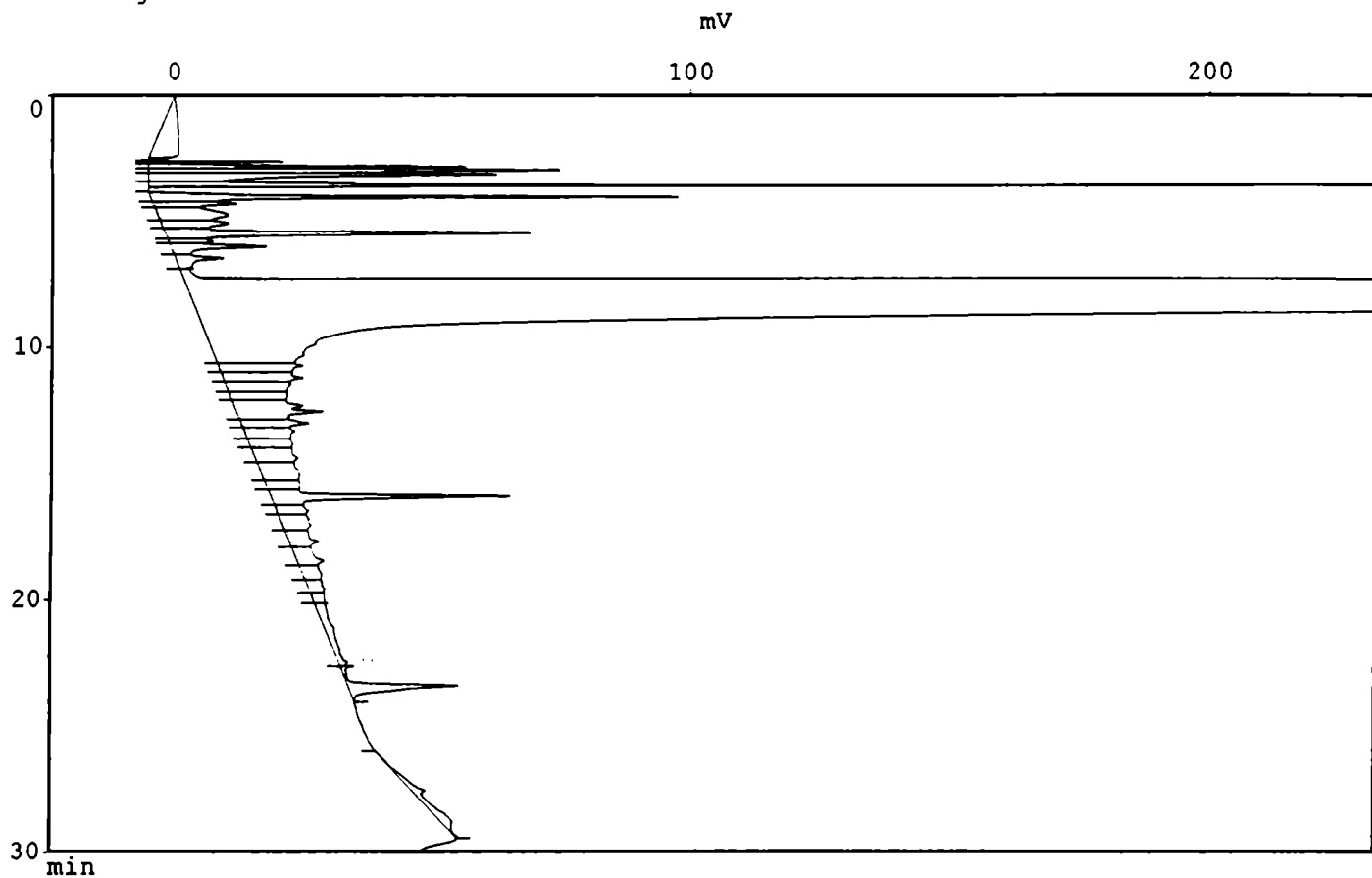
NNP - CRUDA 47.000 CS/ML (MUESTRA 23)

Chromatogram ***



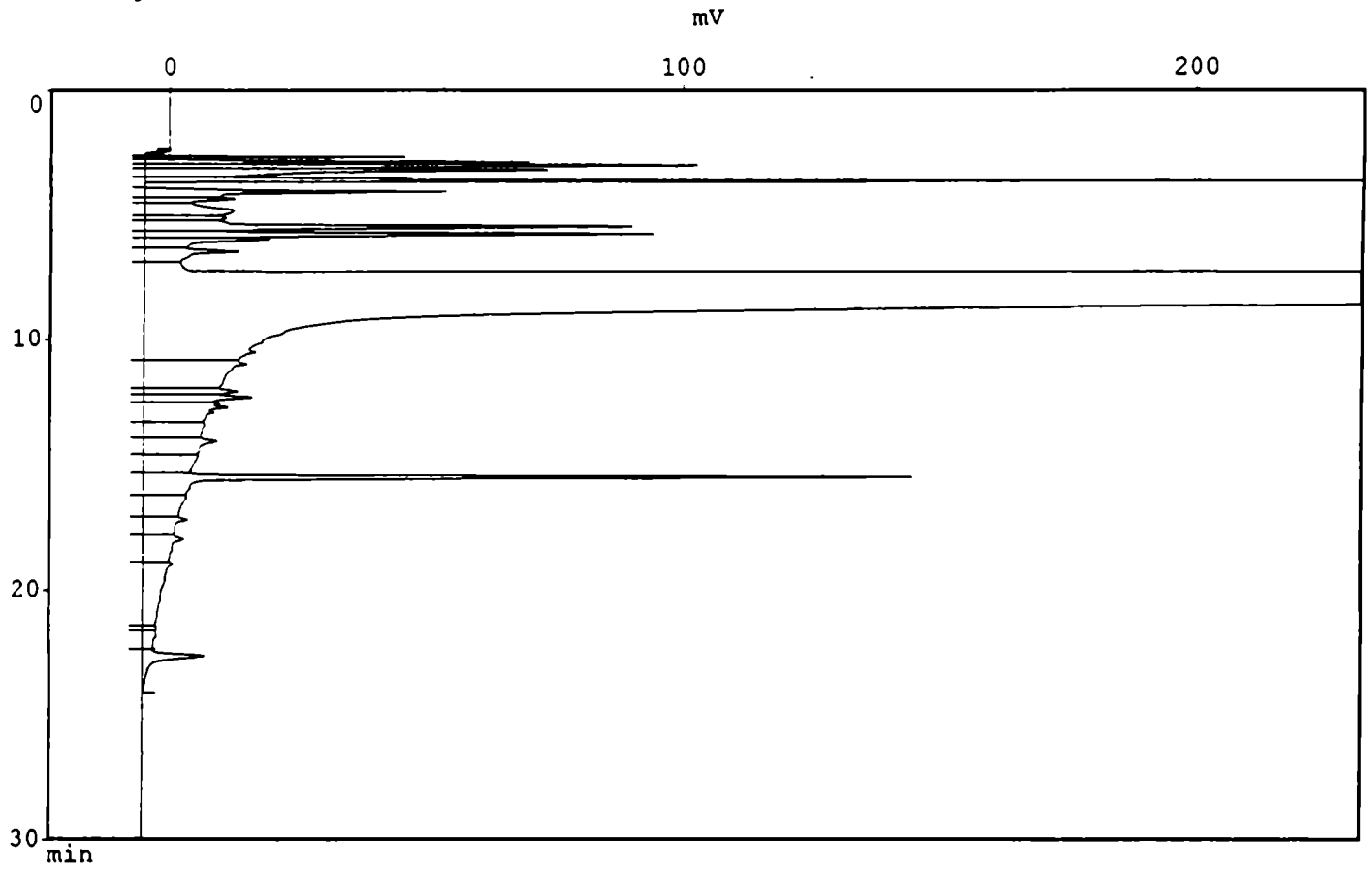
NNP - CRUDA 137.000 CS/ML (MUESTRA 24)

Chromatogram ***



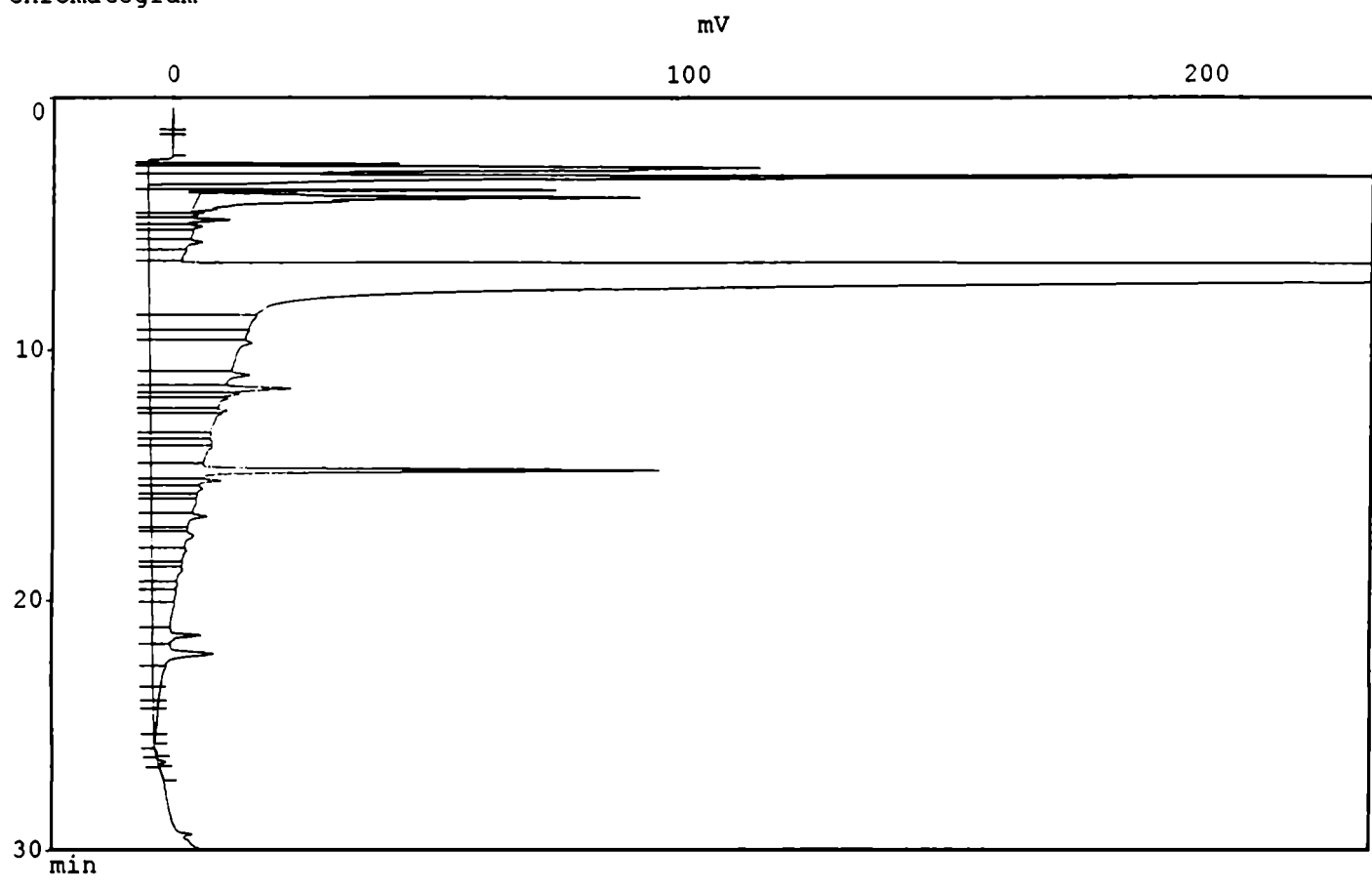
NNP - CRUDA 122.000 CS/ML (MUESTRA 25)

Chromatogram ***



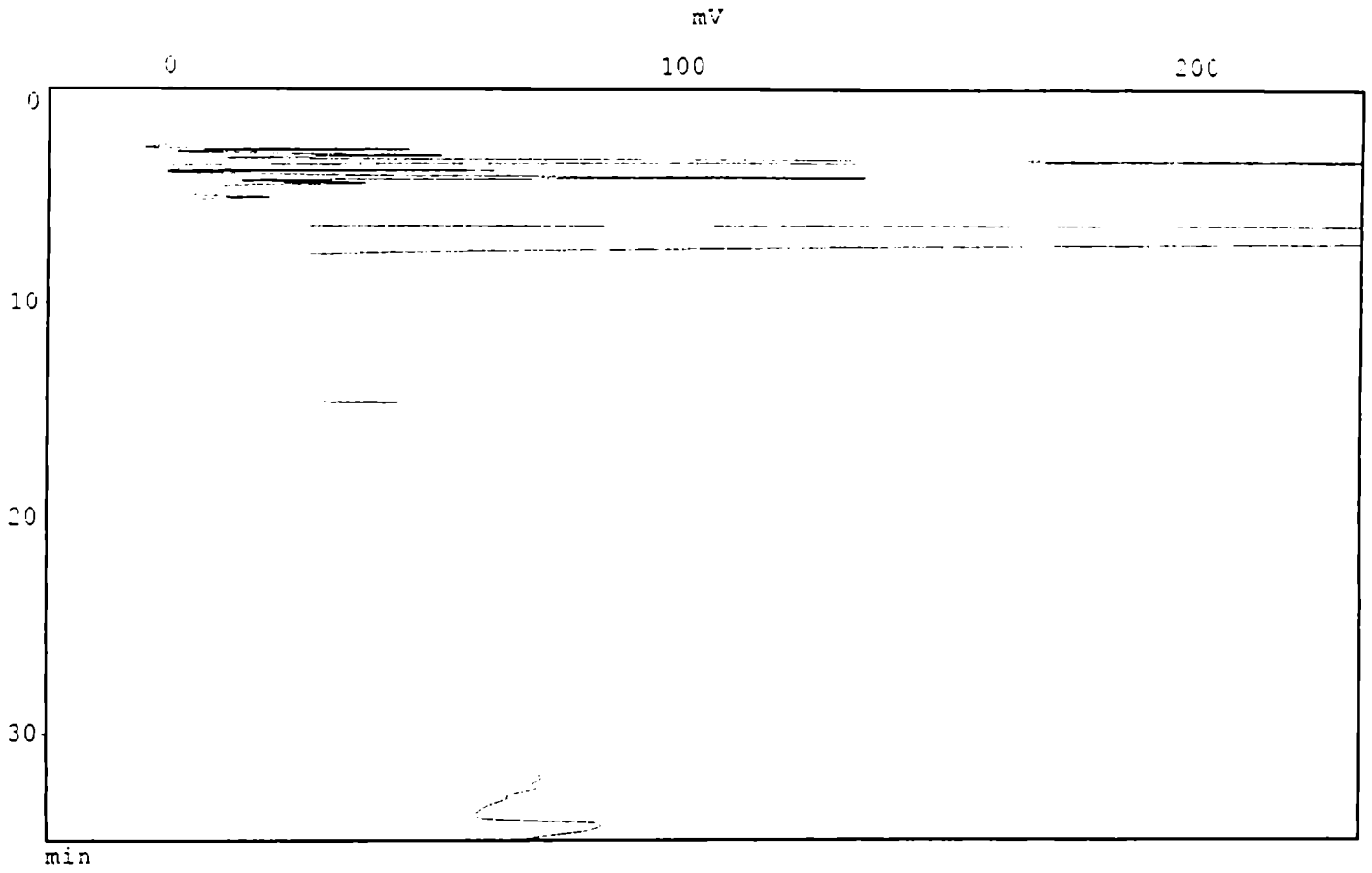
NNP - CRUDA 78.000 CS/ML (MUESTRA 34)

Chromatogram ***

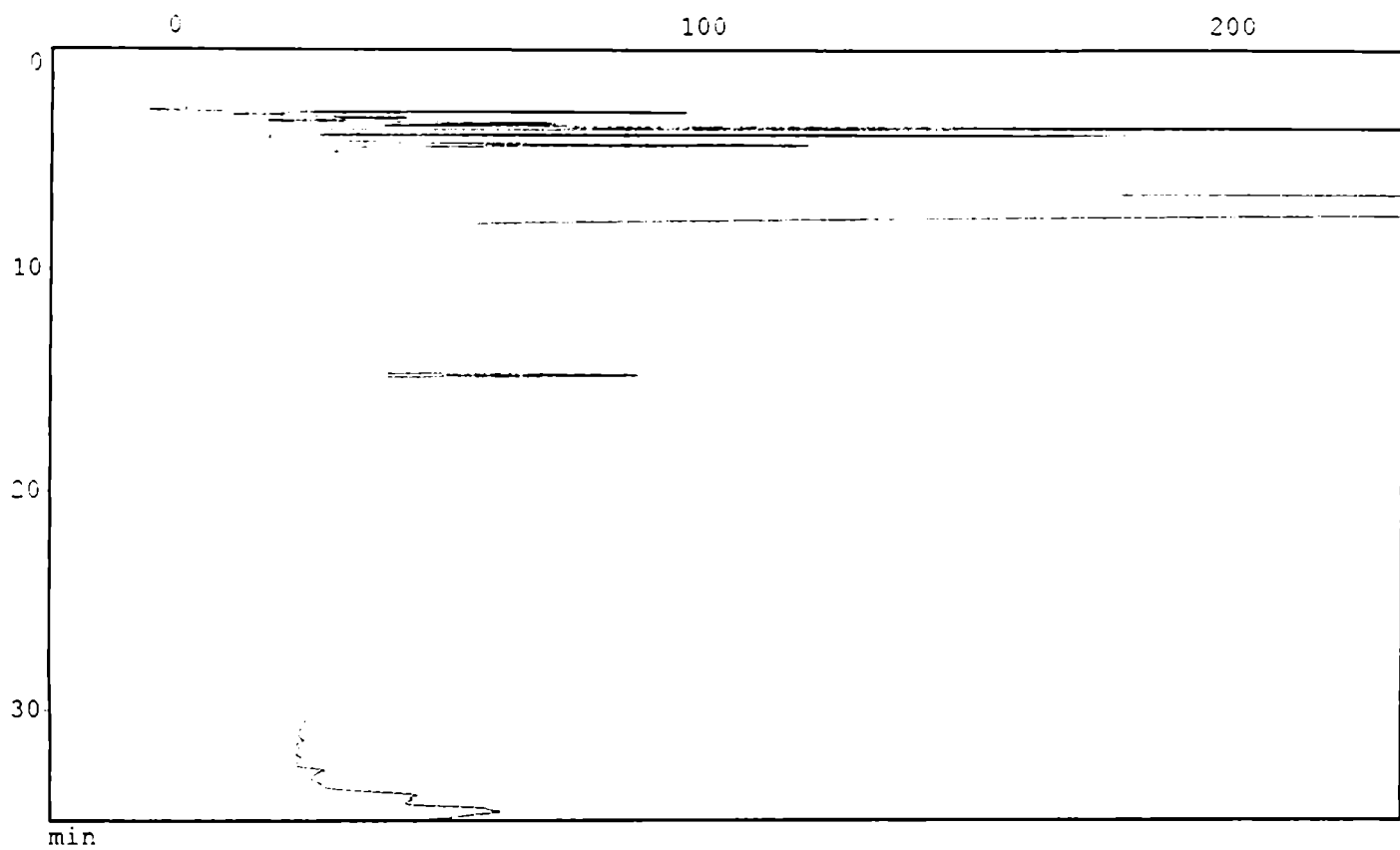


NNP - CRUDA - 0 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 37)

Chromatogram ***

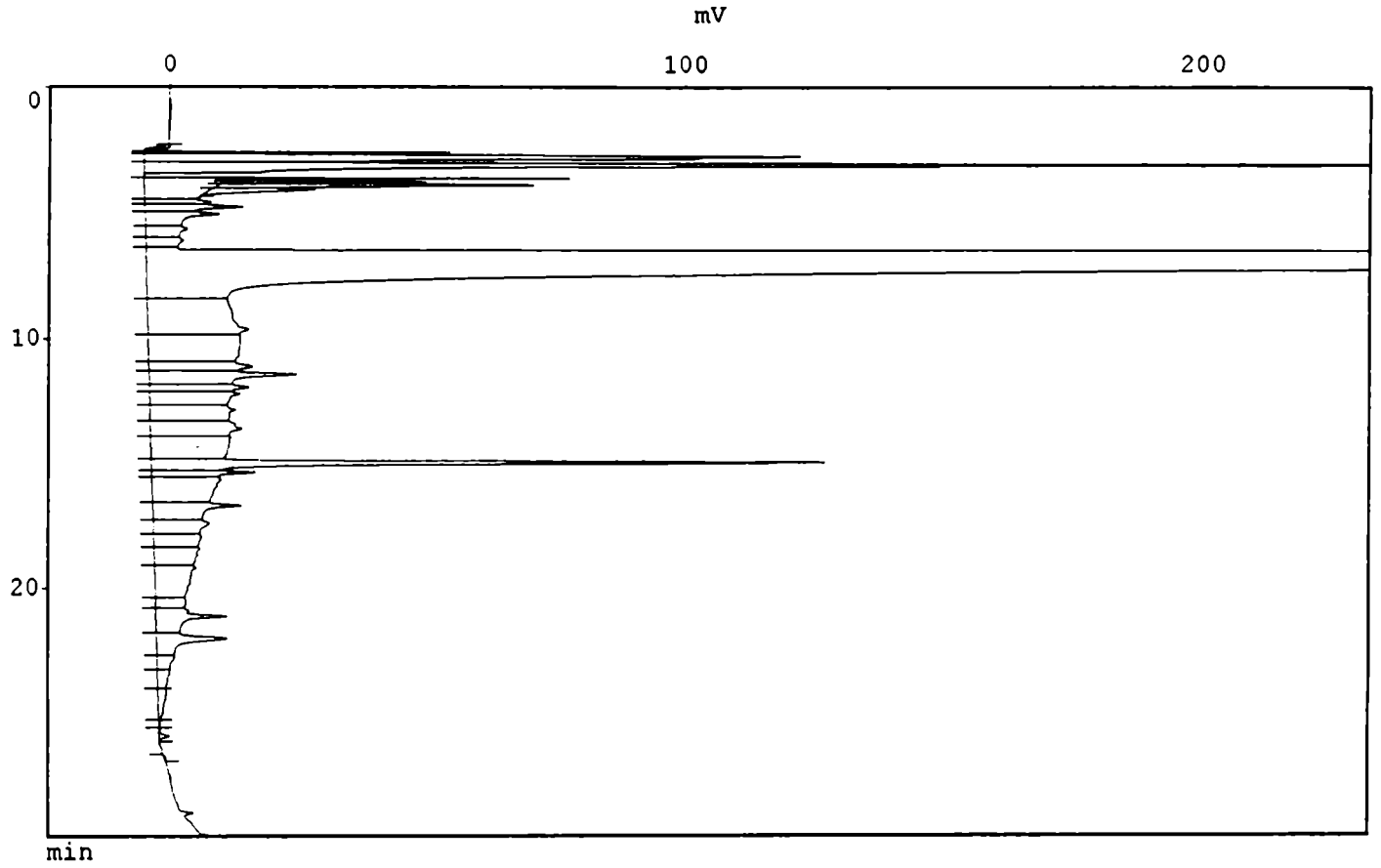


NNP - CRUDA - 0 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 39)



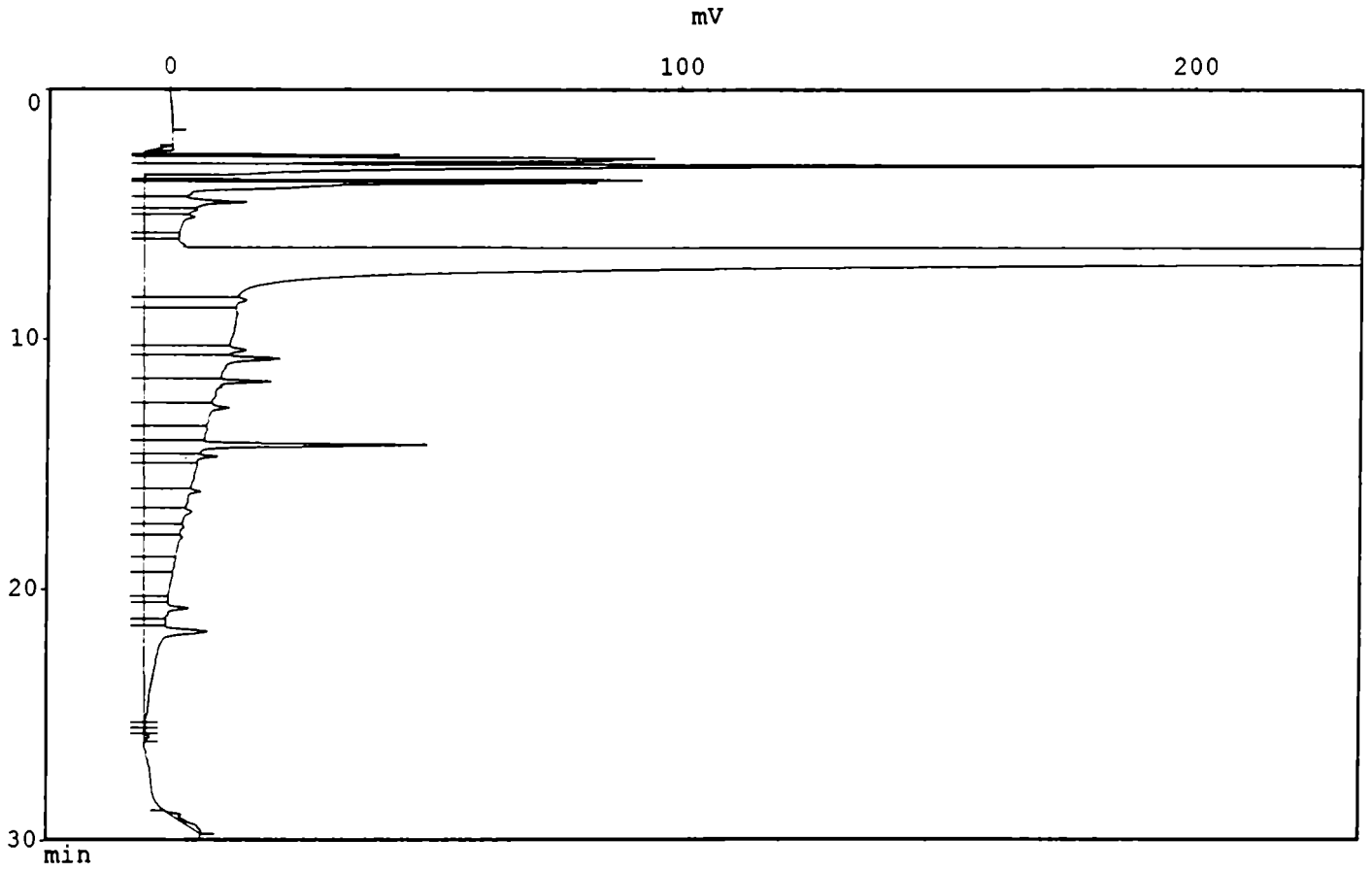
NNP - CRUDA 534.000 CS/ML (MUESTRA 26)

** Chromatogram ***



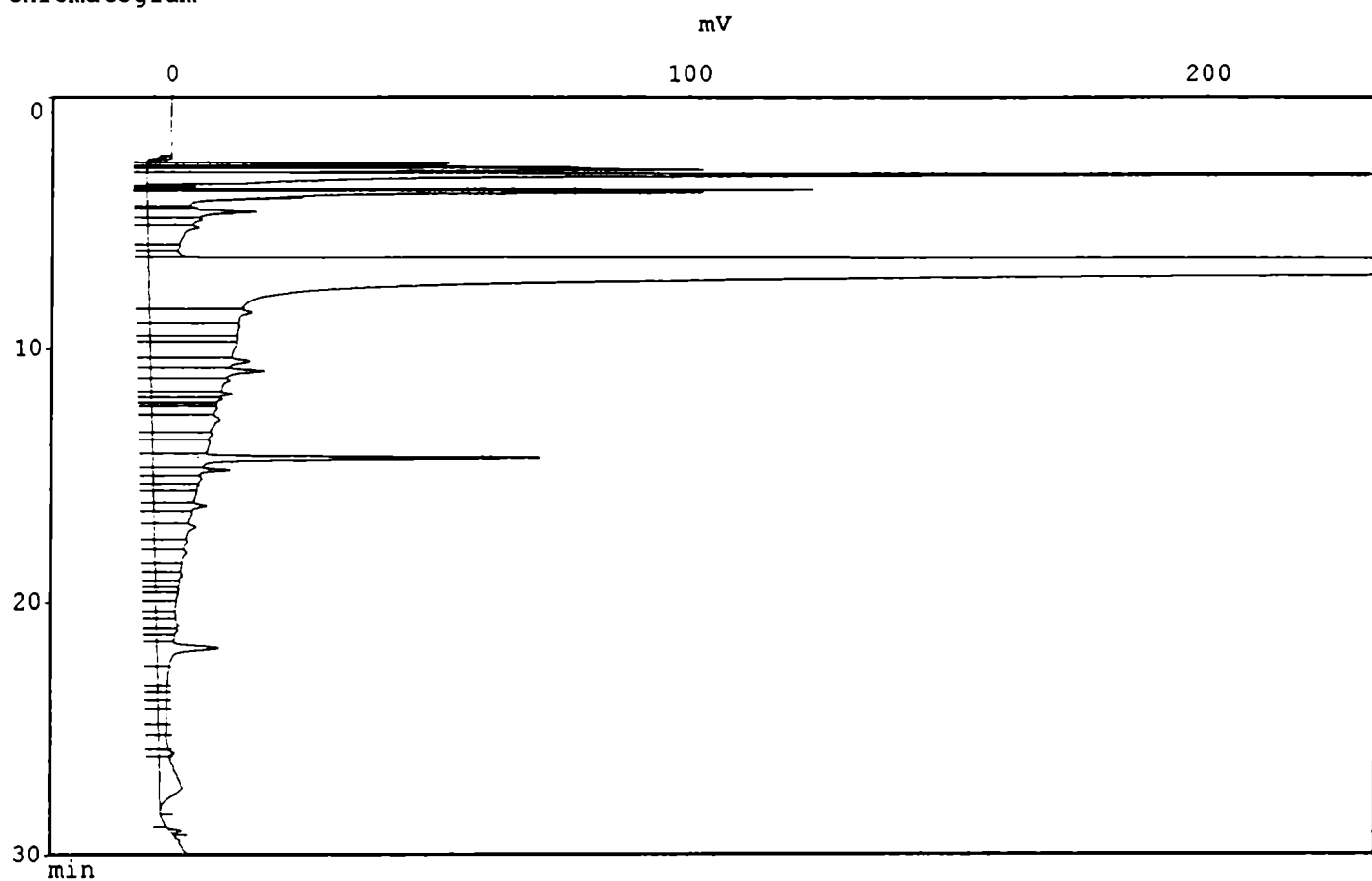
NNP - CRUDA 615.000 CS/ML (MUESTRA 27)

*** Chromatogram ***



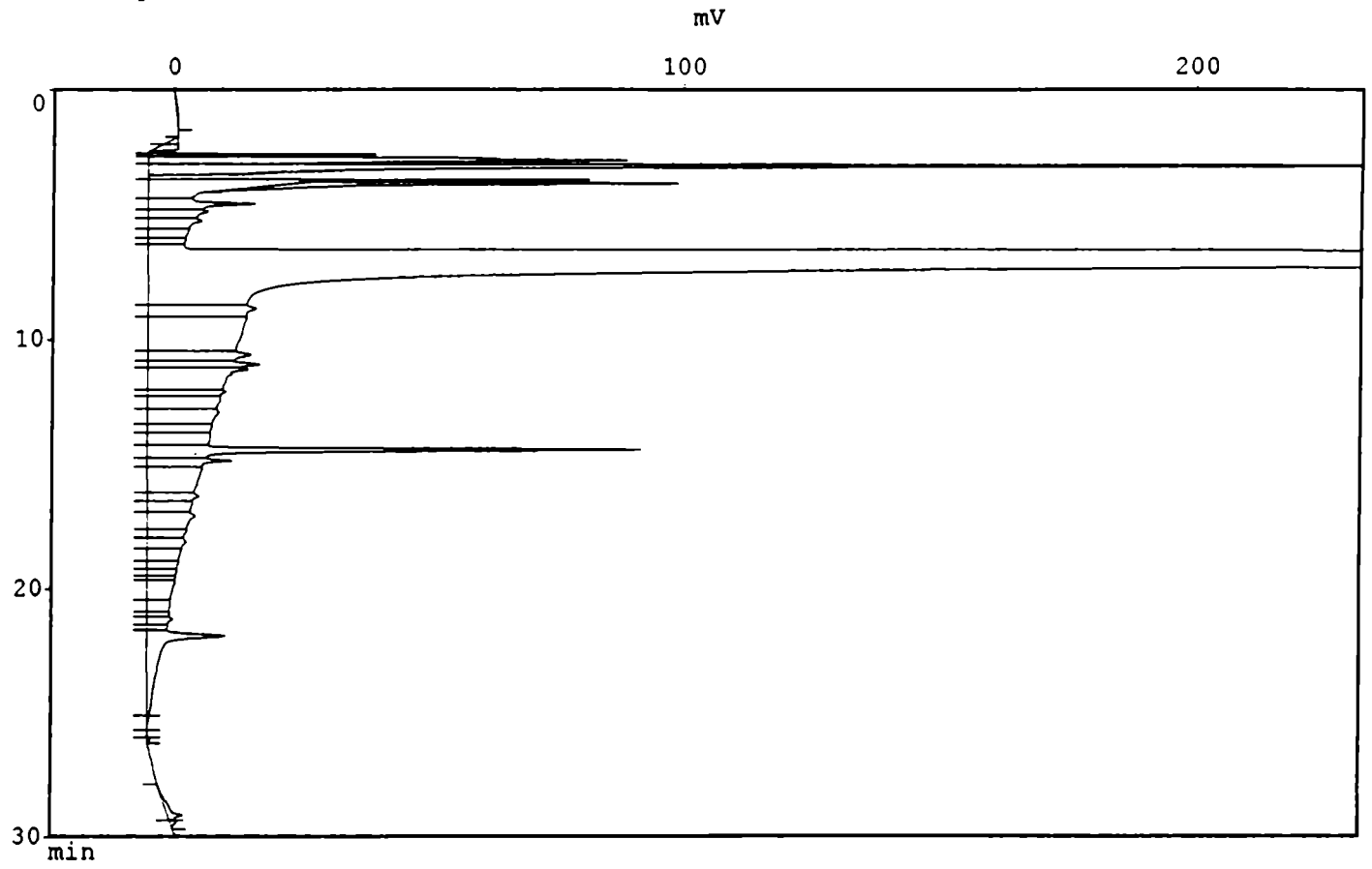
NNP - CRUDA 646.000 CS/ML (MUESTRA 28)

*** Chromatogram ***



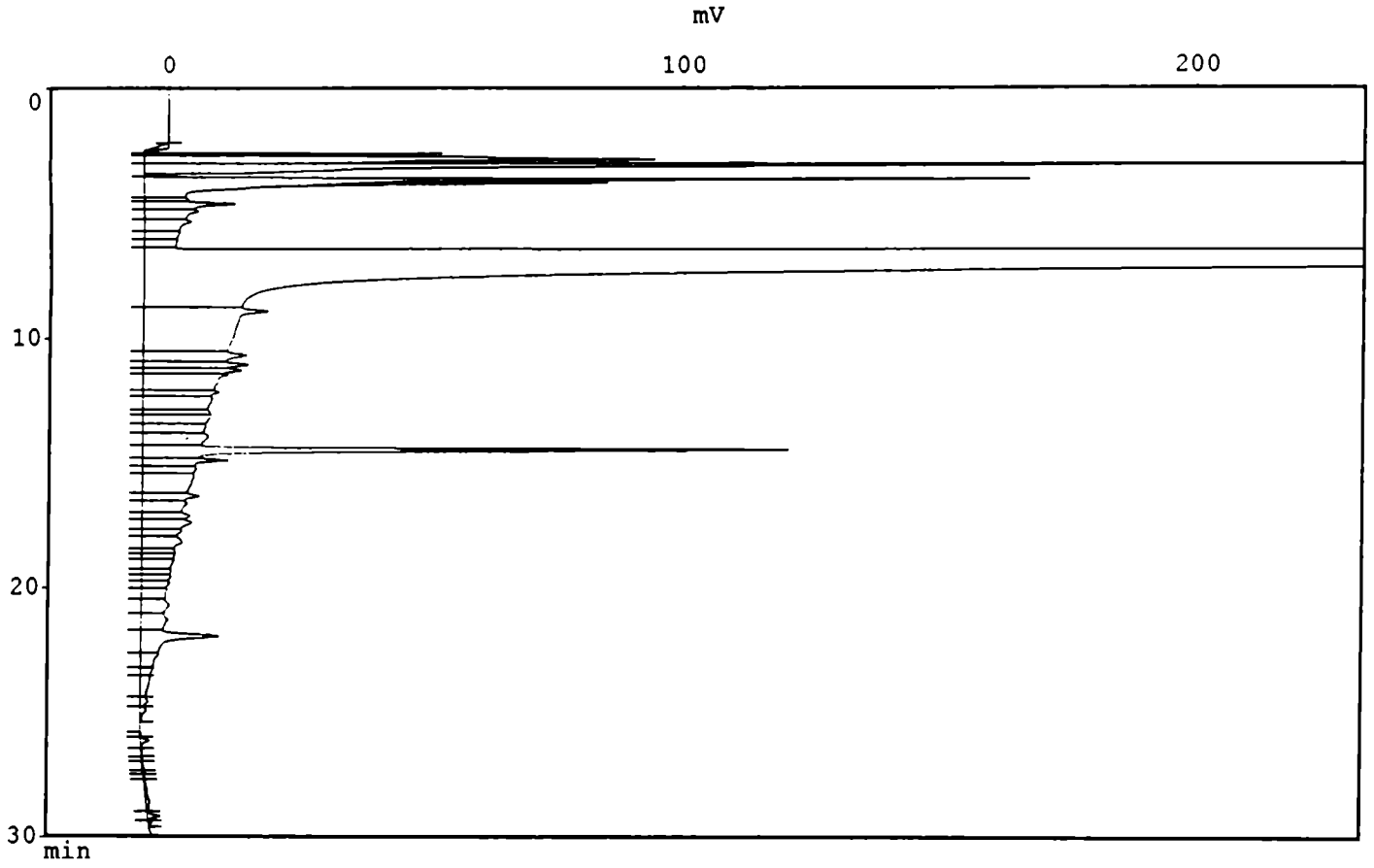
NNP - CRUDA 662.000 CS/ML (MUESTRA 29)

Chromatogram ***



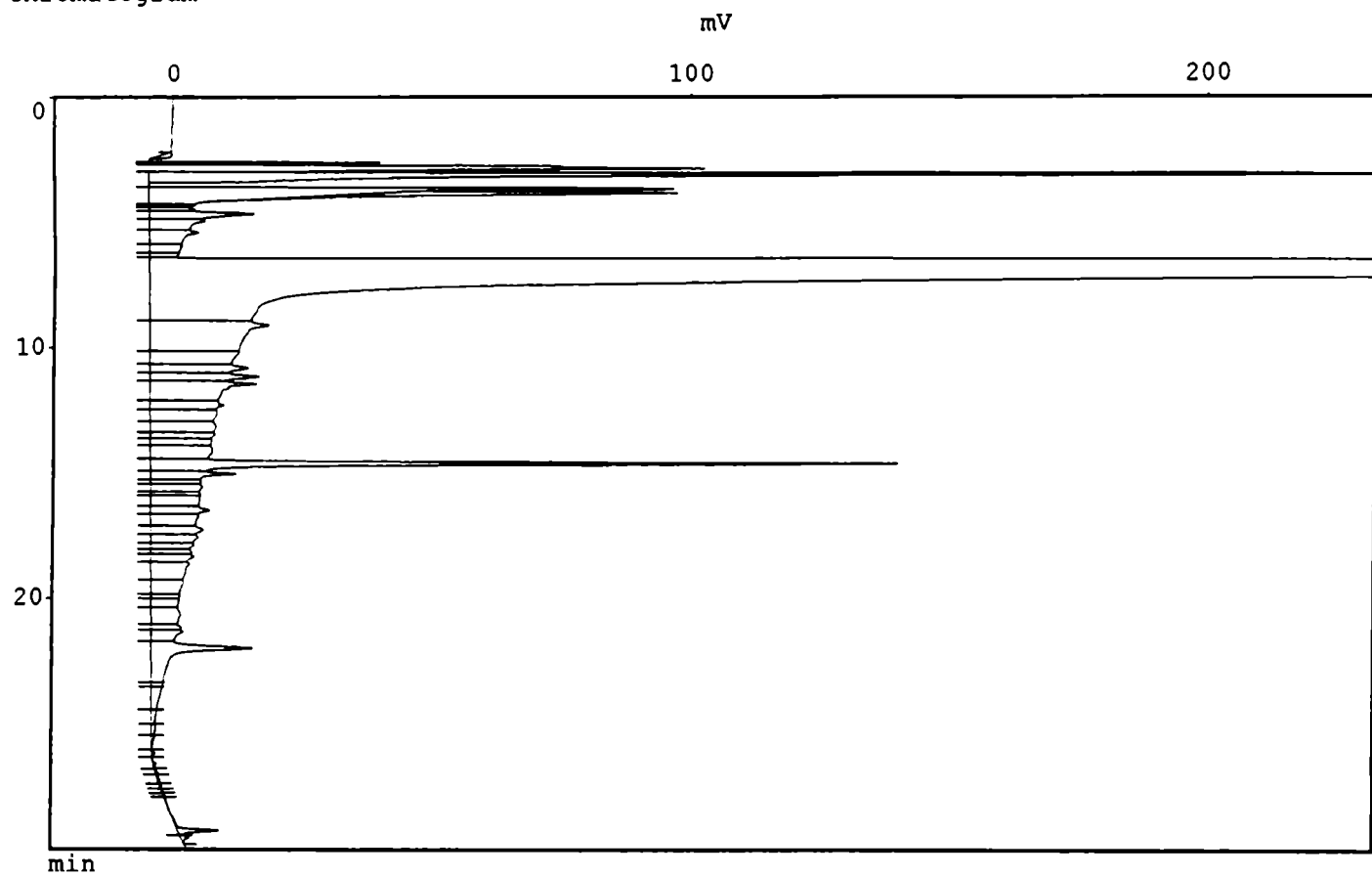
NNP - CRUDA 1.143.000 CS/ML (MUESTRA 30)

Chromatogram ***



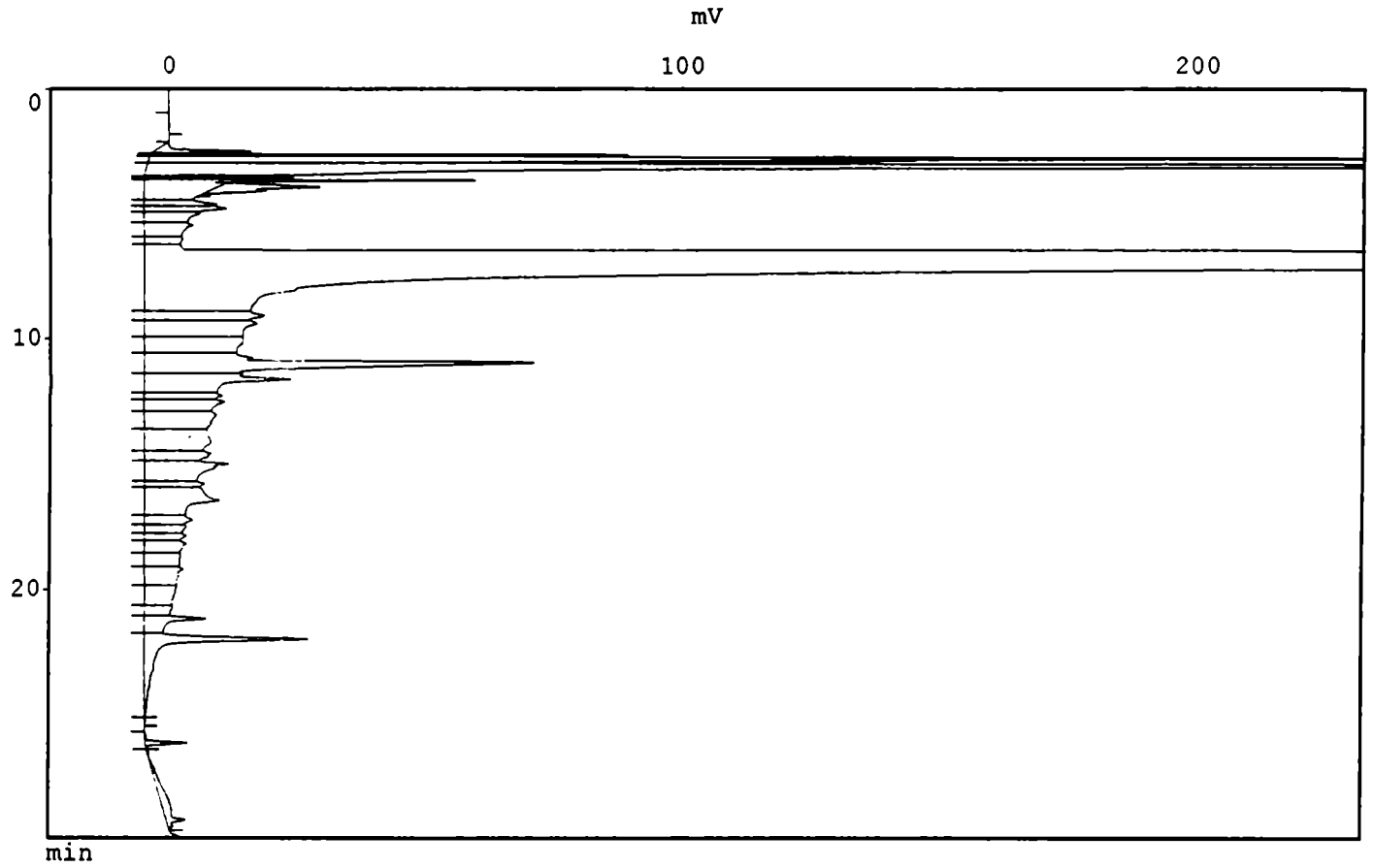
NNP - CRUDA 1.000.000 CS/ML (MUESTRA 31)

Chromatogram ***



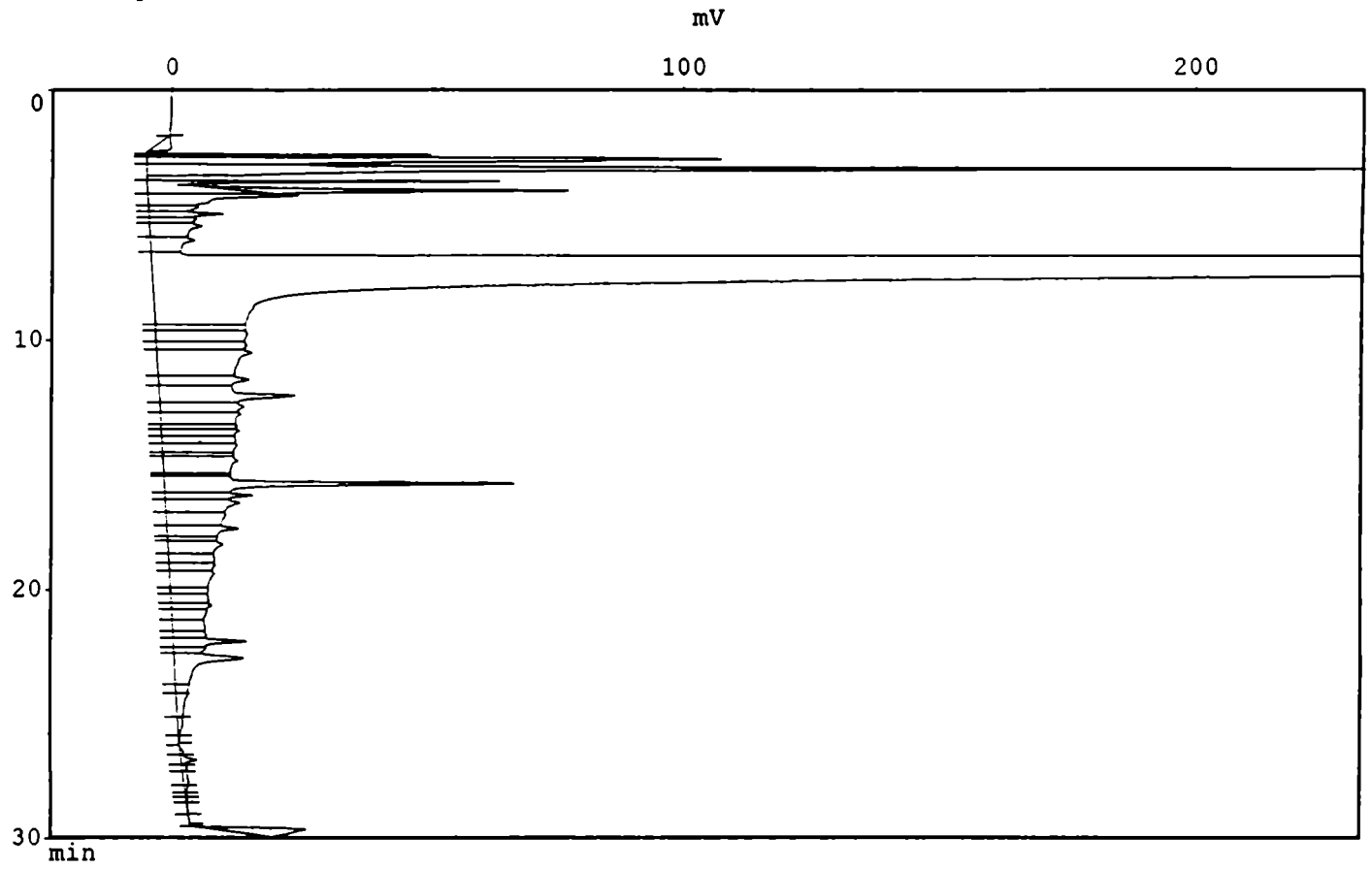
NNP - CRUDA 1.000.000 CS/ML (MUESTRA 32)

Chromatogram ***



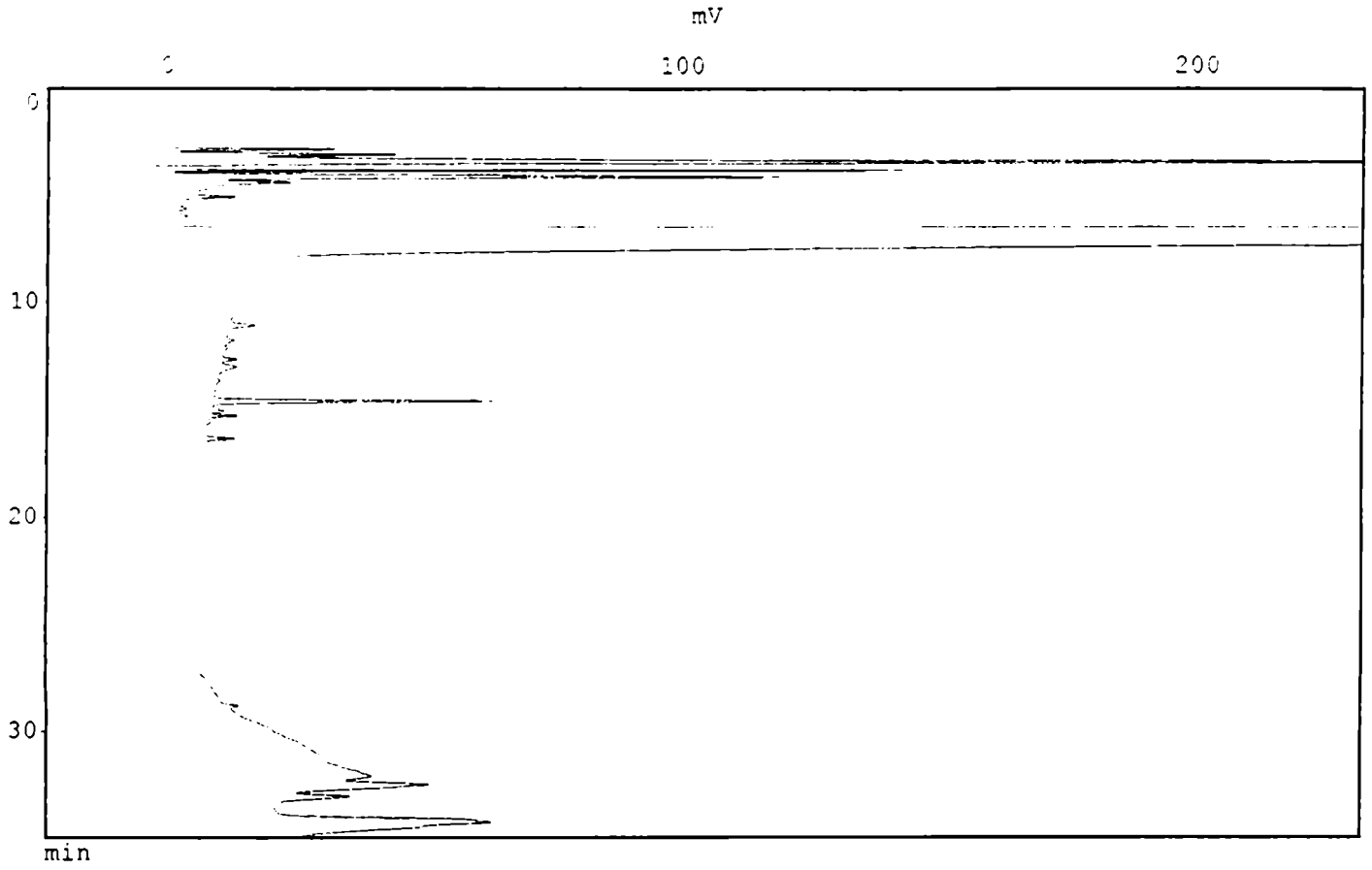
NNP - CRUDA 1.722.000 CS/ML (MUESTRA 33)

Chromatogram ***



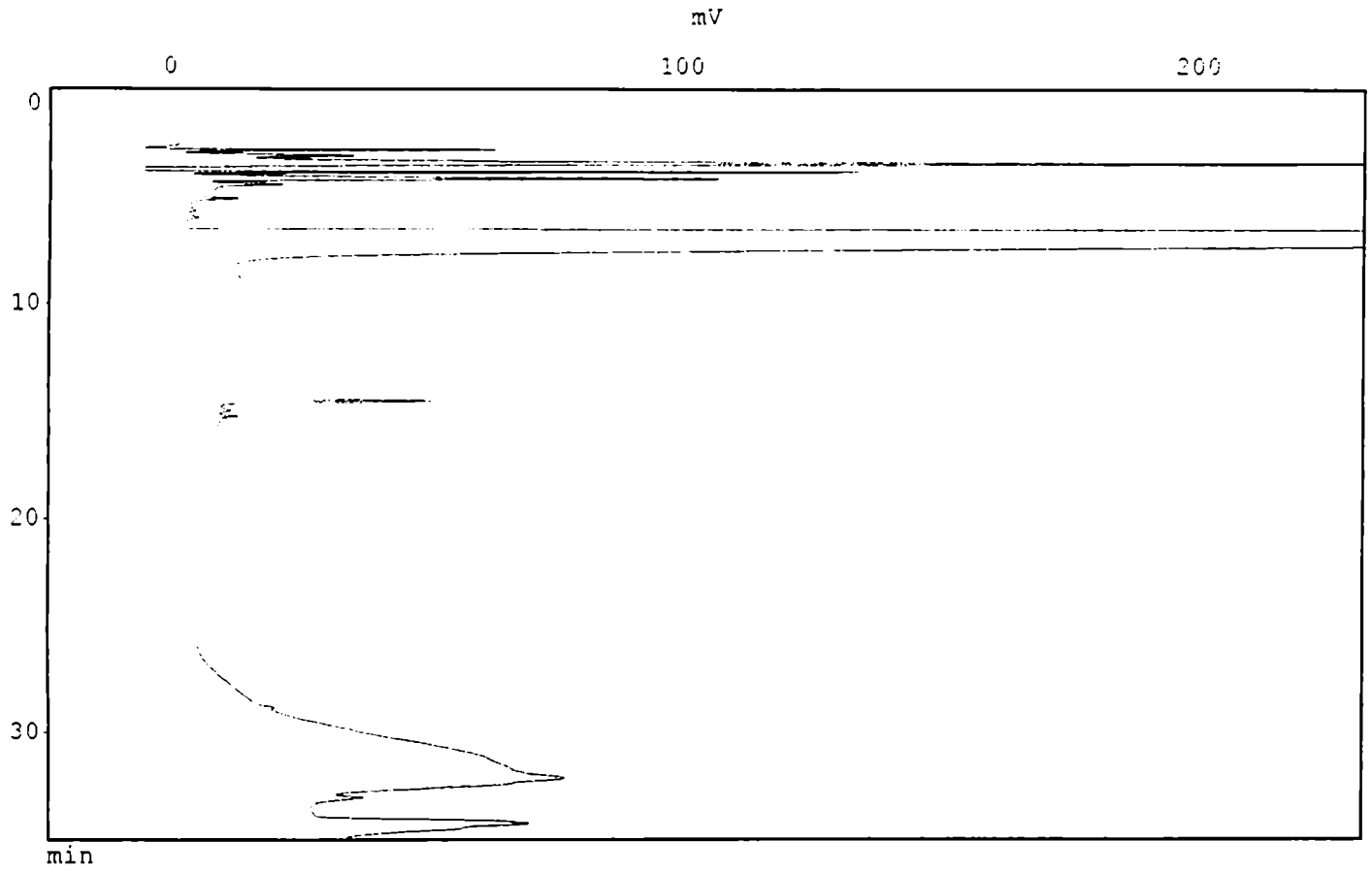
NNP - CRUDA - 0 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 40)

*** Chromatogram ***



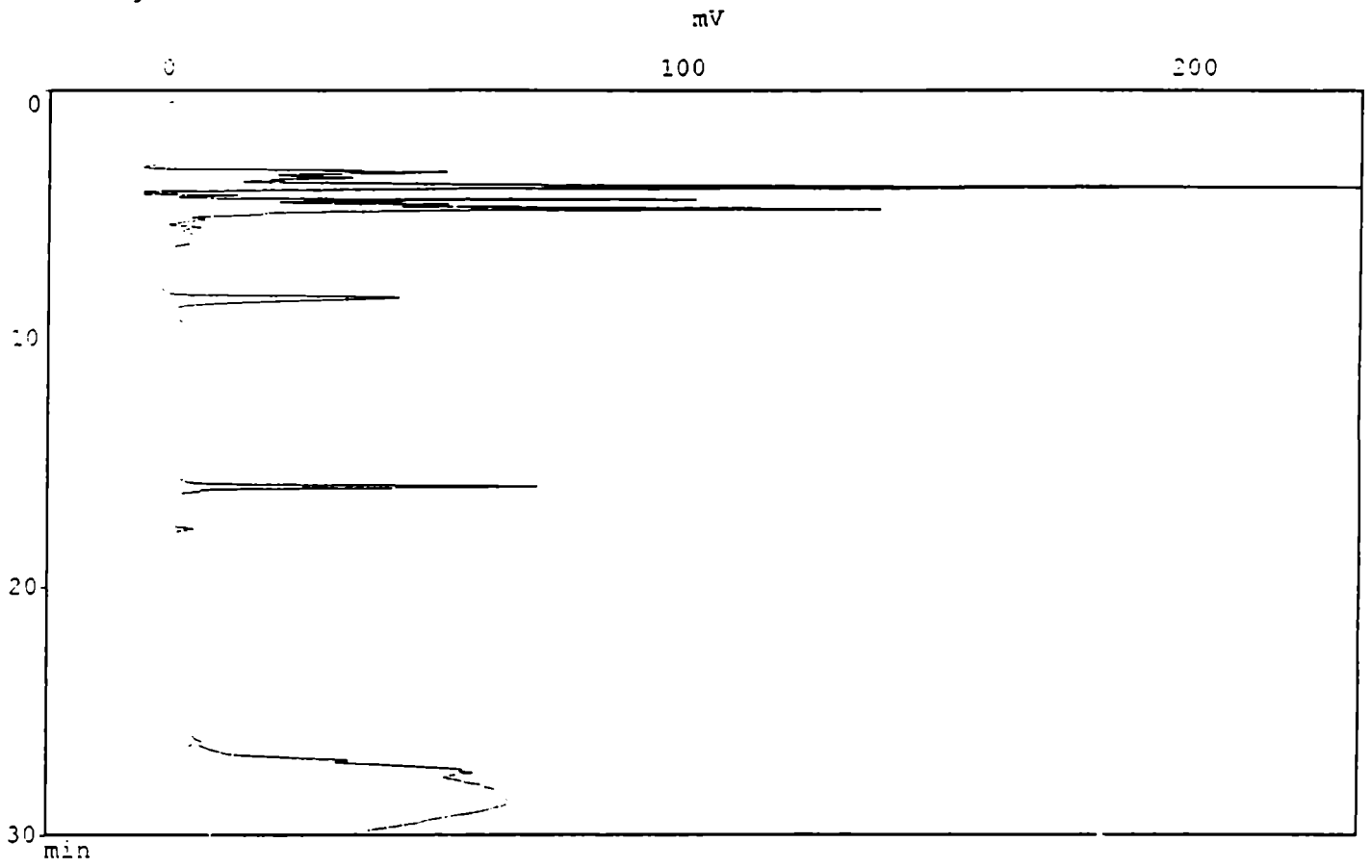
NNP - CRUDA - 0 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 41)

Chromatogram ***



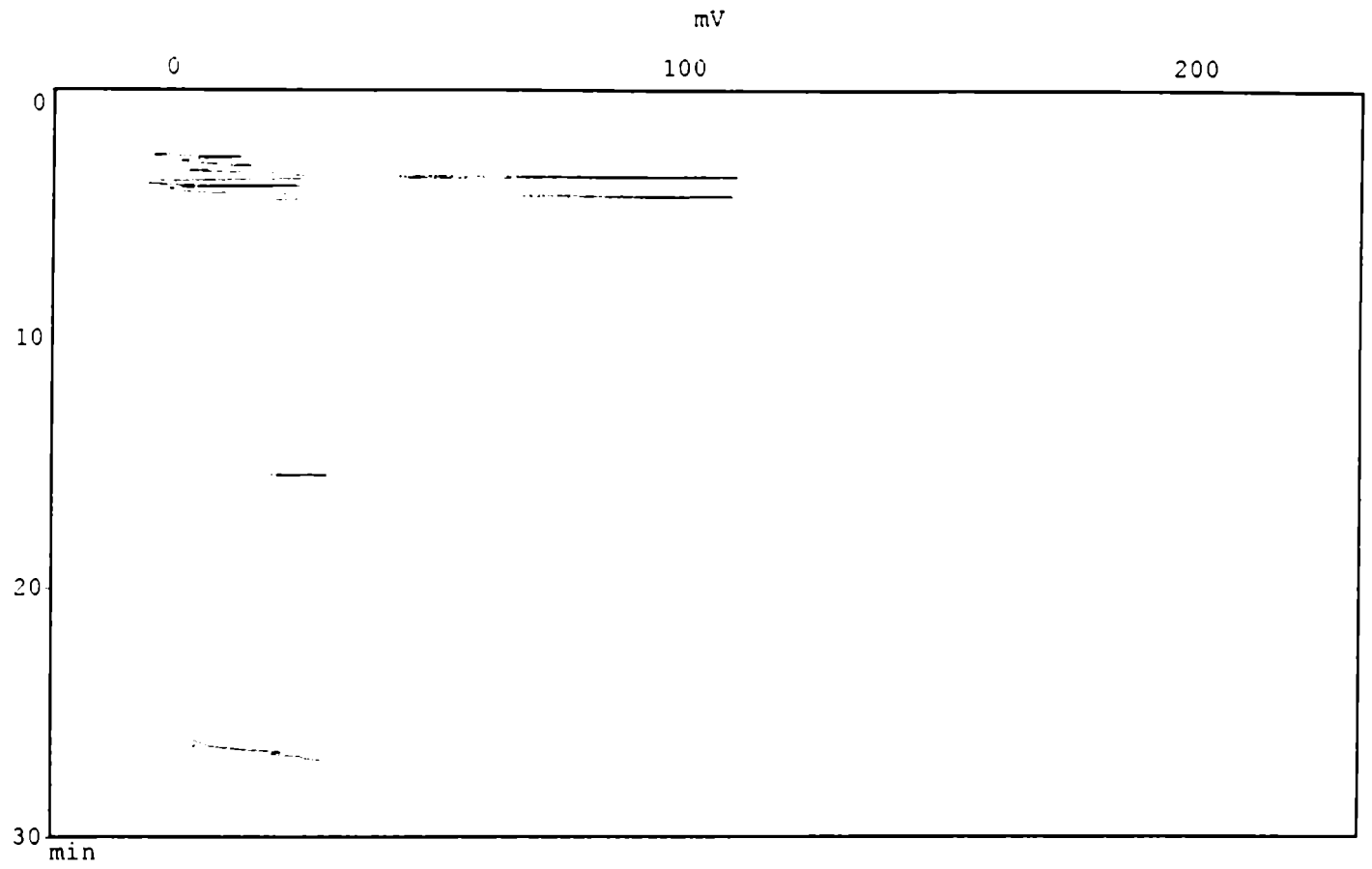
LECHES CON TRATAMIENTO TERMICO

Chromatogram ***



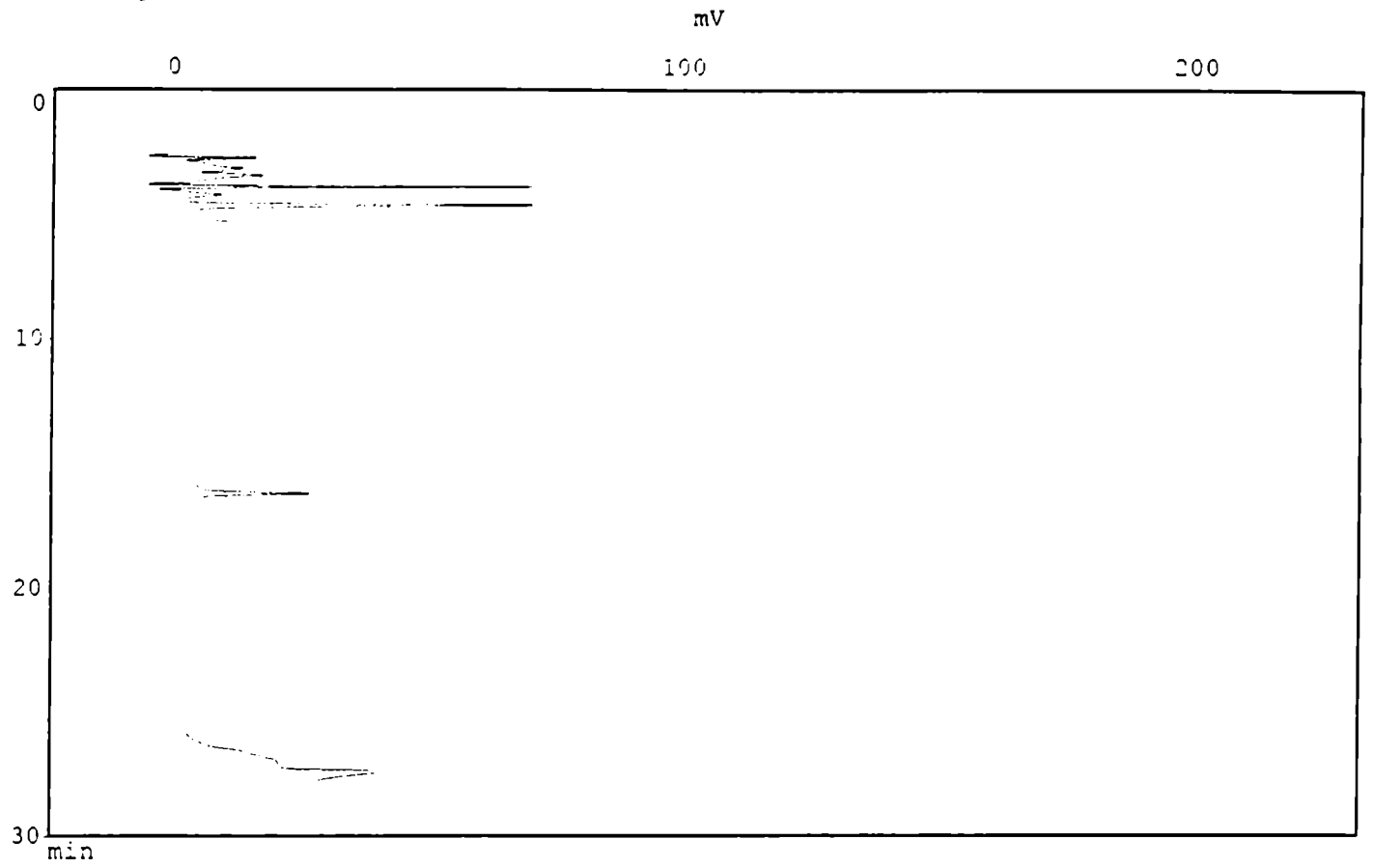
NS - UAT ENTERA (MUESTRA 1)

Chromatogram ***



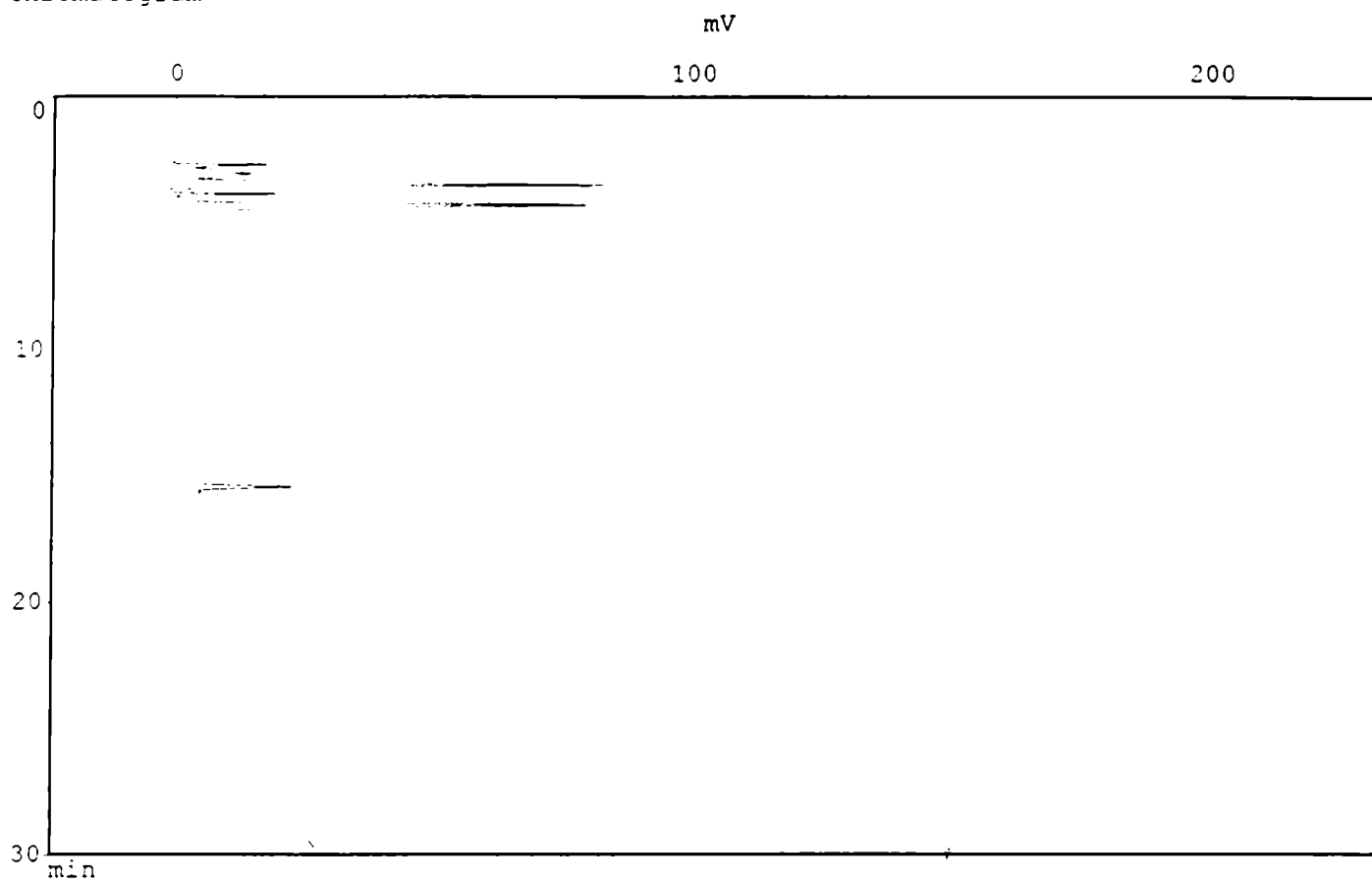
NS - UAT DESCREMADA (MUESTRA 2)

Chromatogram ***



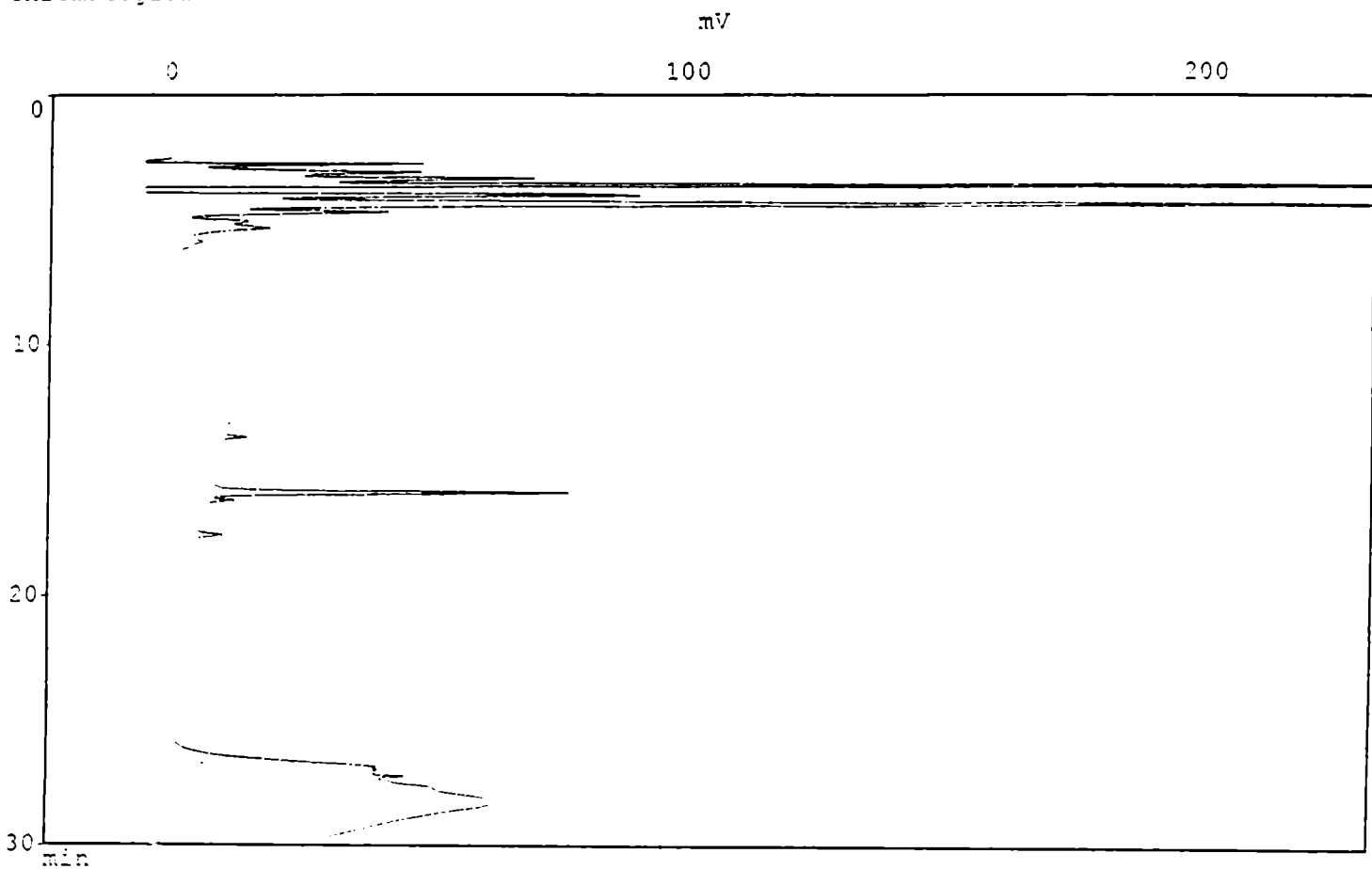
NS - UAT (MUESTRA 4)

*** Chromatogram ***



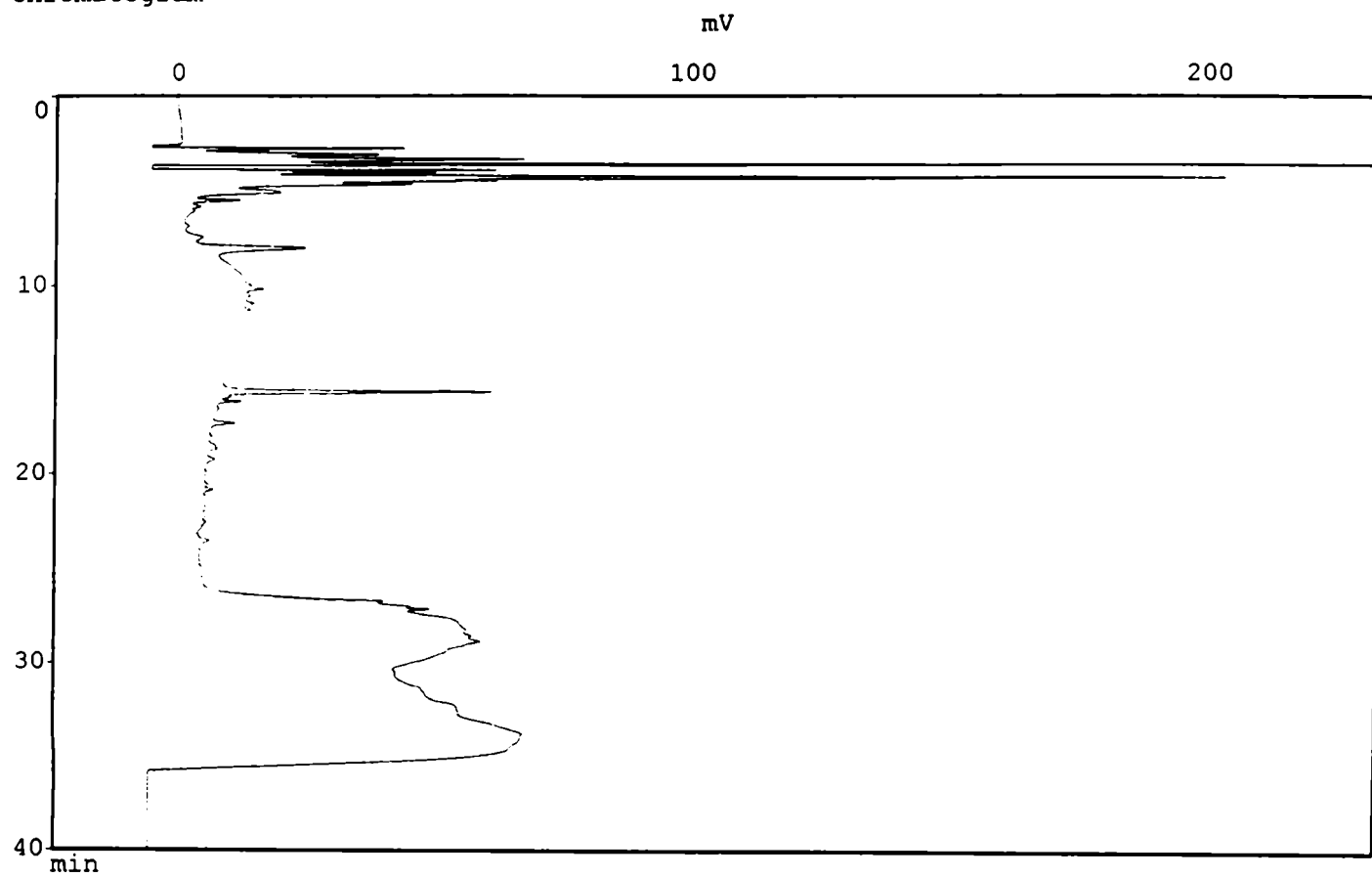
NS - UAT ENTERA (MUESTRA 5)

Chromatogram ***



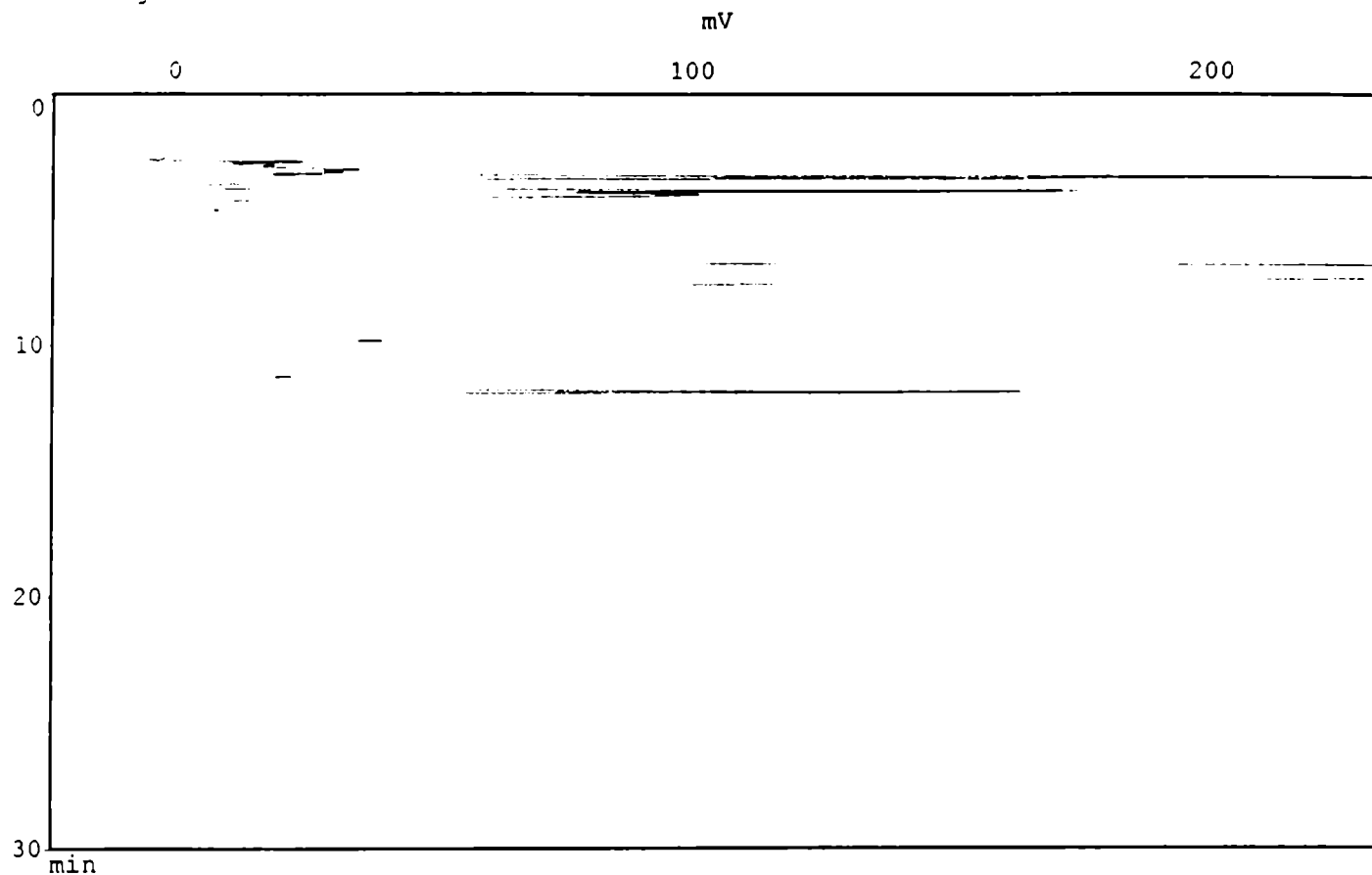
NS - ULTRAPASTEURIZADA ENTERA ORGANICA (MUESTRA 10)

Chromatogram ***



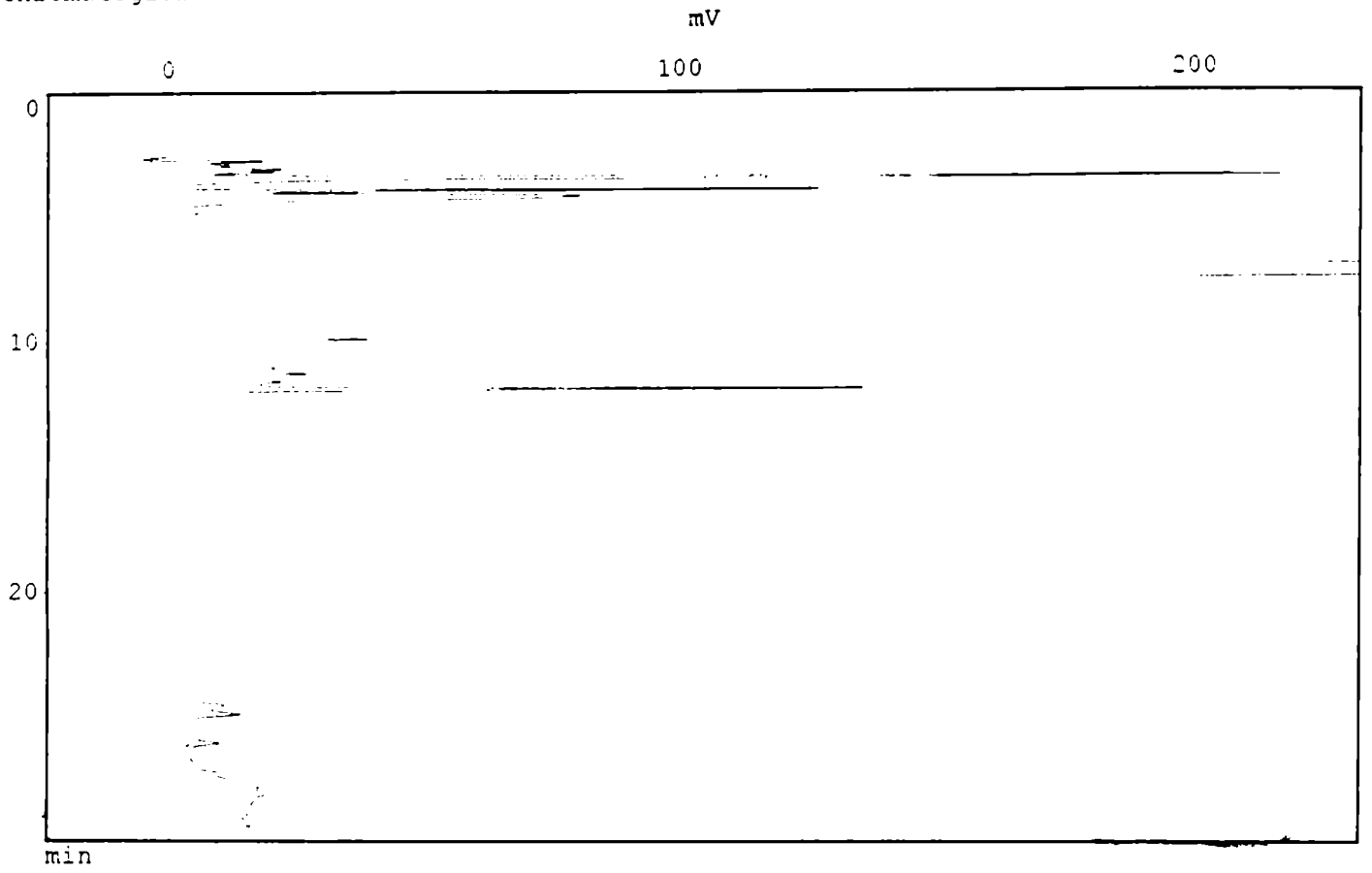
NS - UAT (MUESTRA 15)

Chromatogram ***



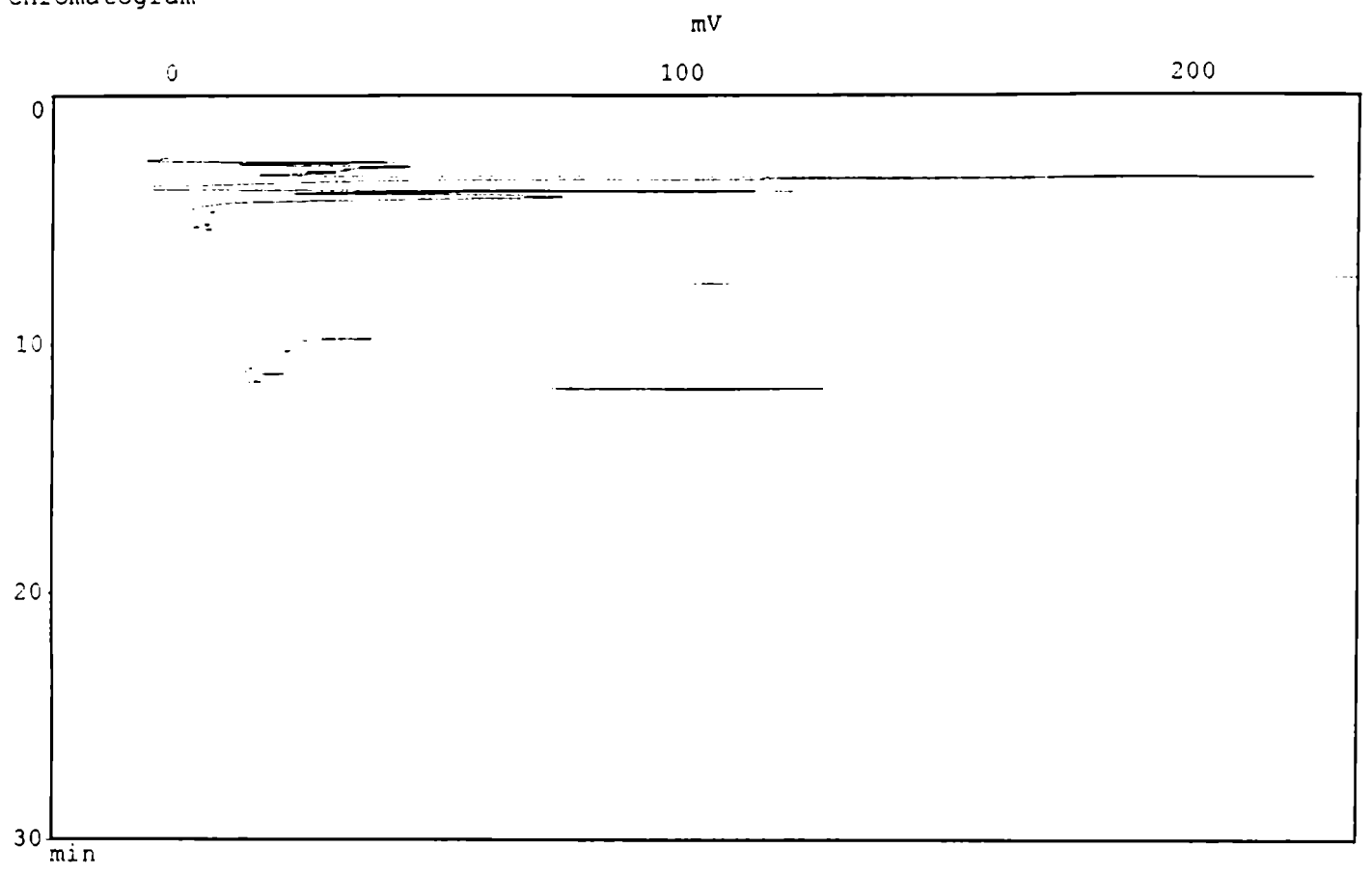
NNP - UAT ENTERA (MUESTRA 1)

Chromatogram ***



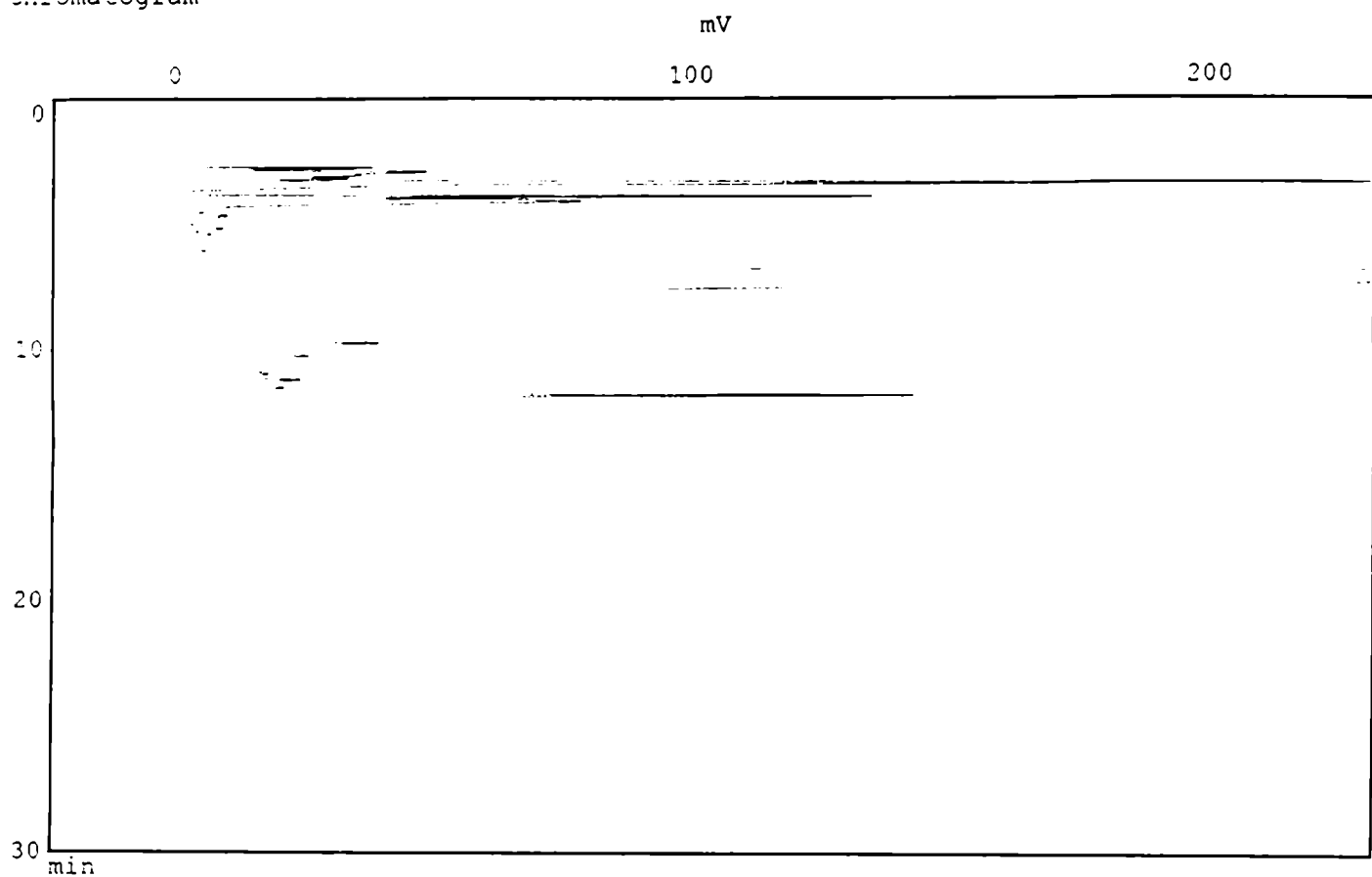
NNP - UAT DESCREMADA (MUESTRA 2)

Chromatogram ***



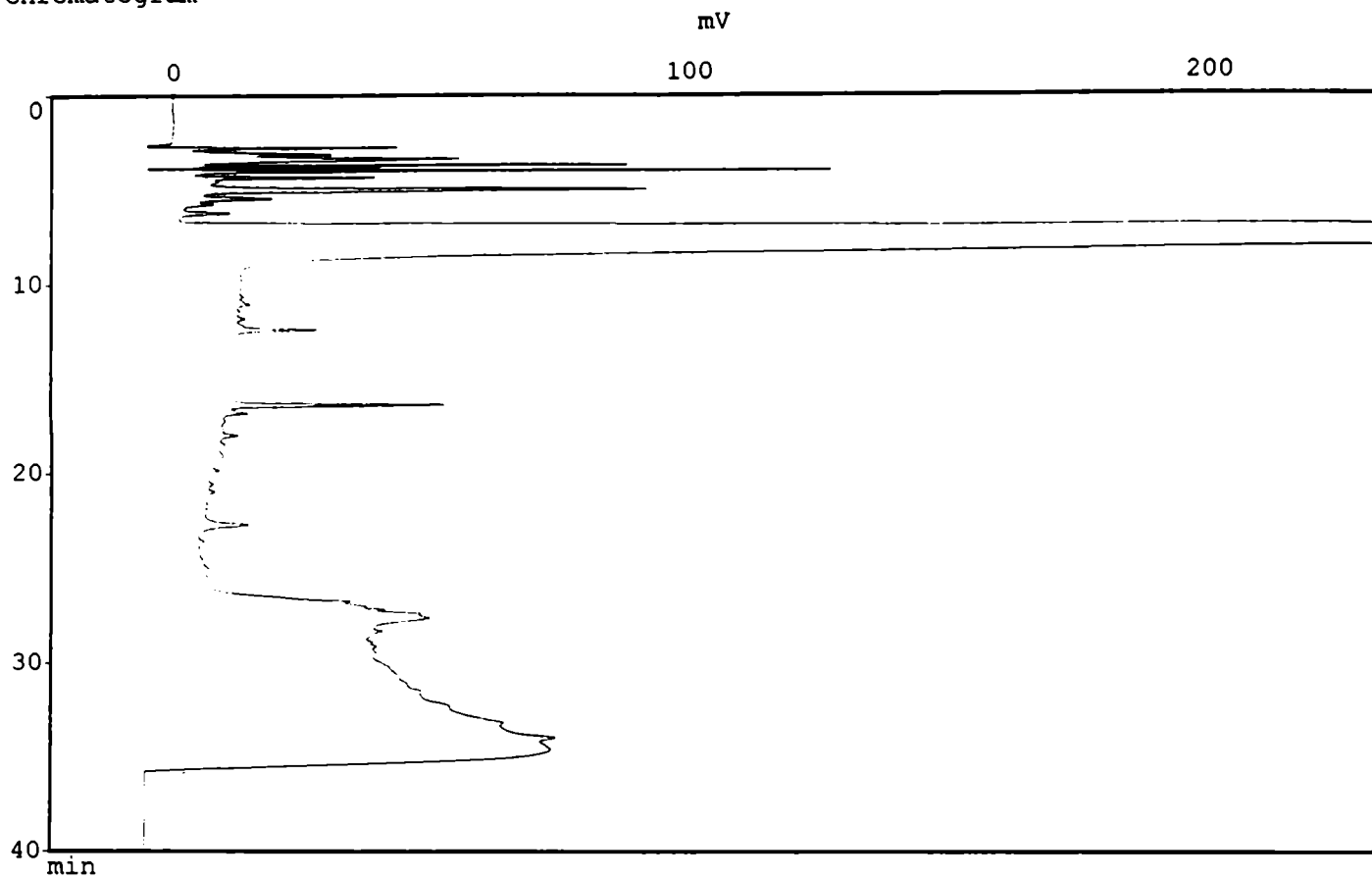
NNP - UAT ENTERA (MUESTRA 3)

Chromatogram ***



NNP - UAT DESCREMADA (MUESTRA 4)

Chromatogram ***

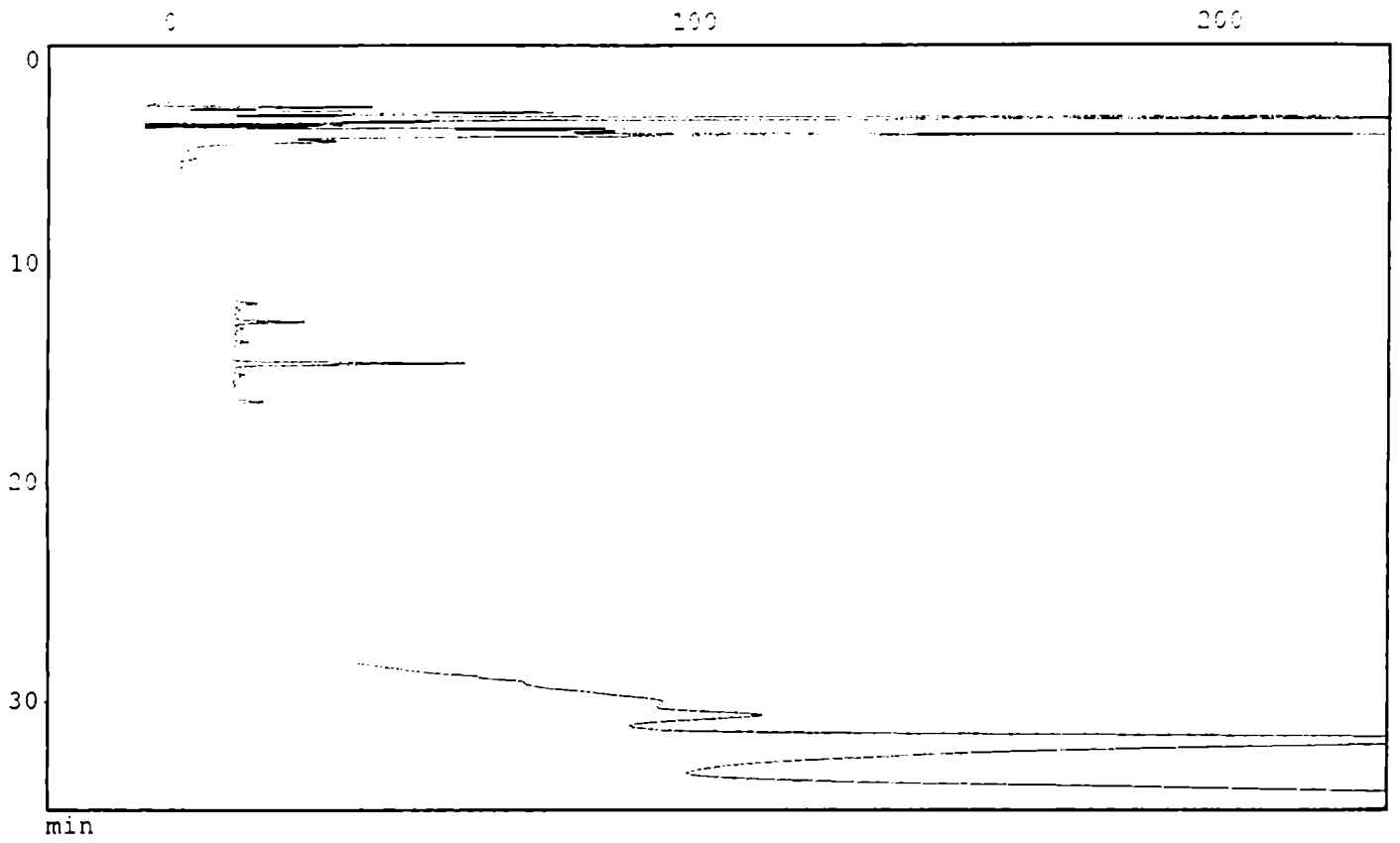


NNP - UAT DESCREMADA (MUESTRA 15)

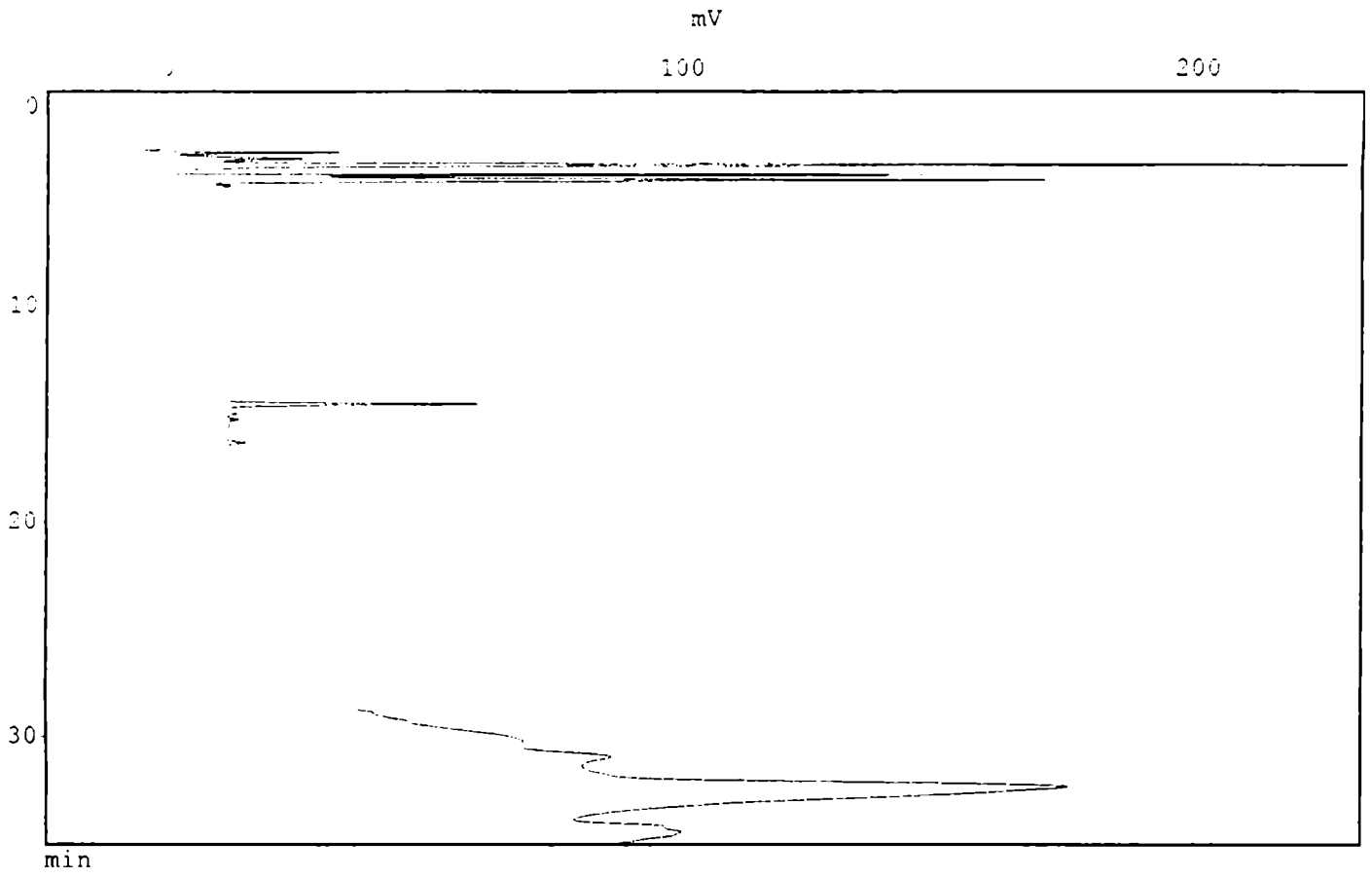
LECHES CON INDUCCION DE PROTEOLISIS

NS - CRUDA - 2 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 37)

*** Chromatogram ***

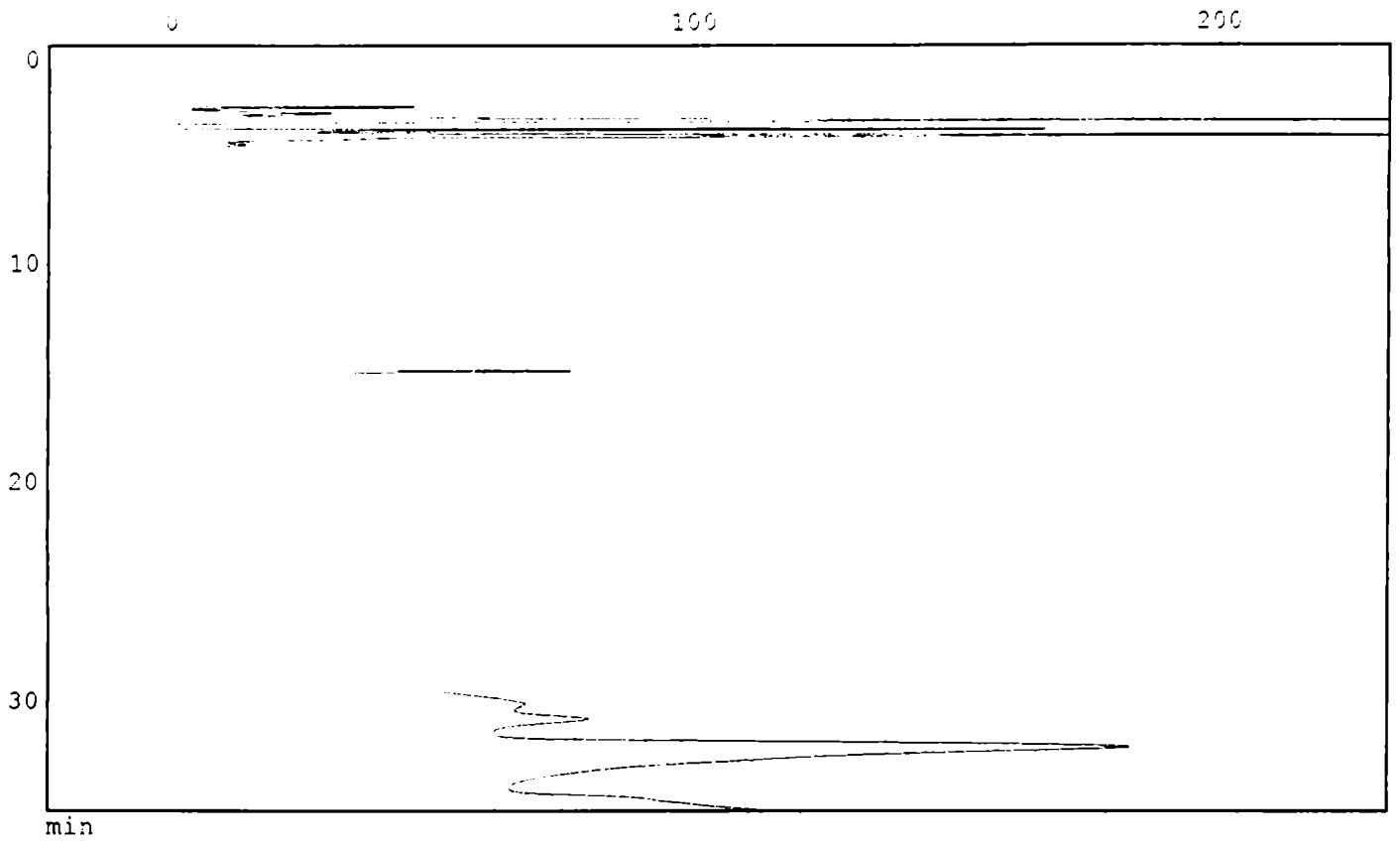


NS - CRUDA - 2 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 38)



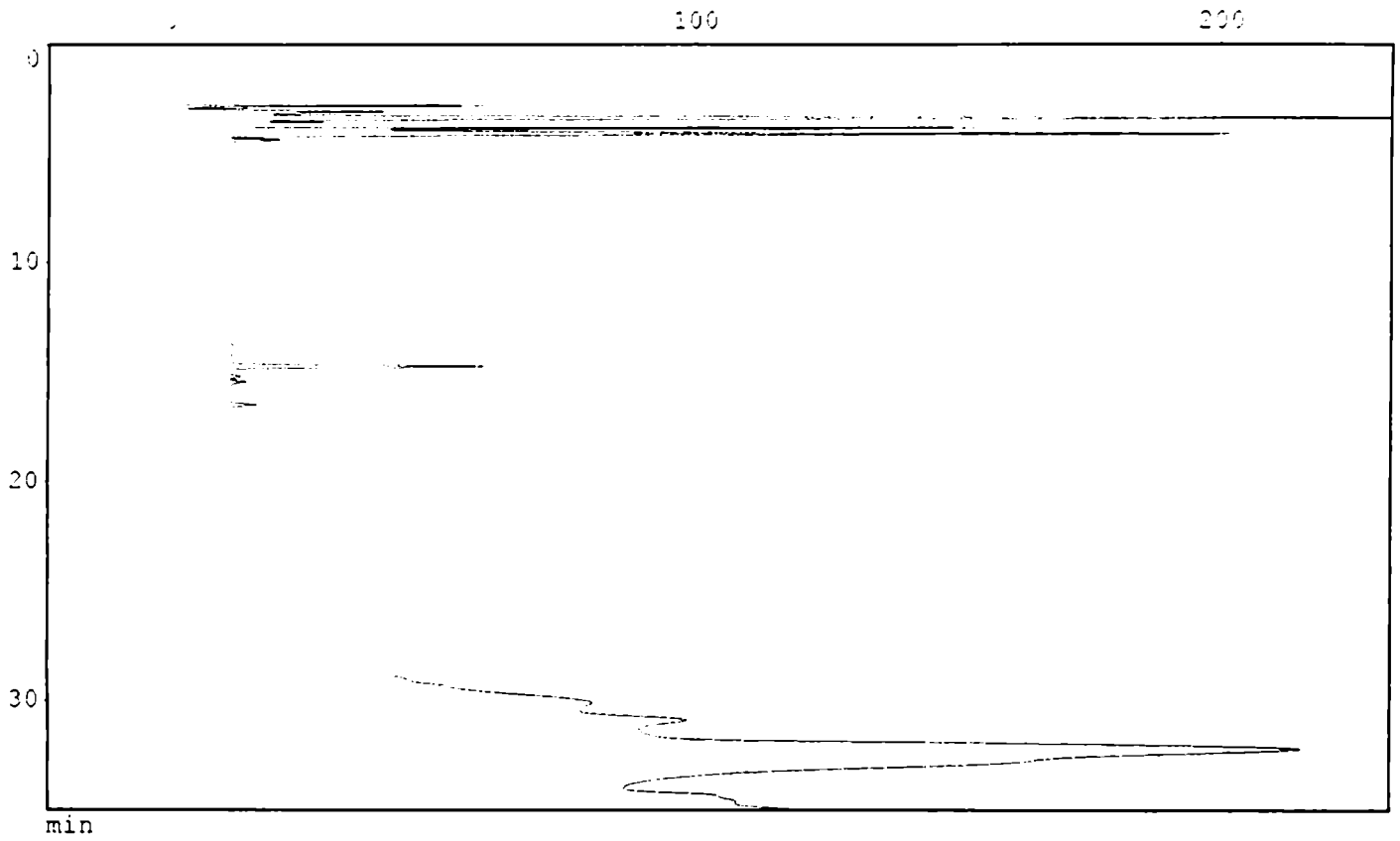
NS - CRUDA - 2 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 39)

*** Chromatogram ***

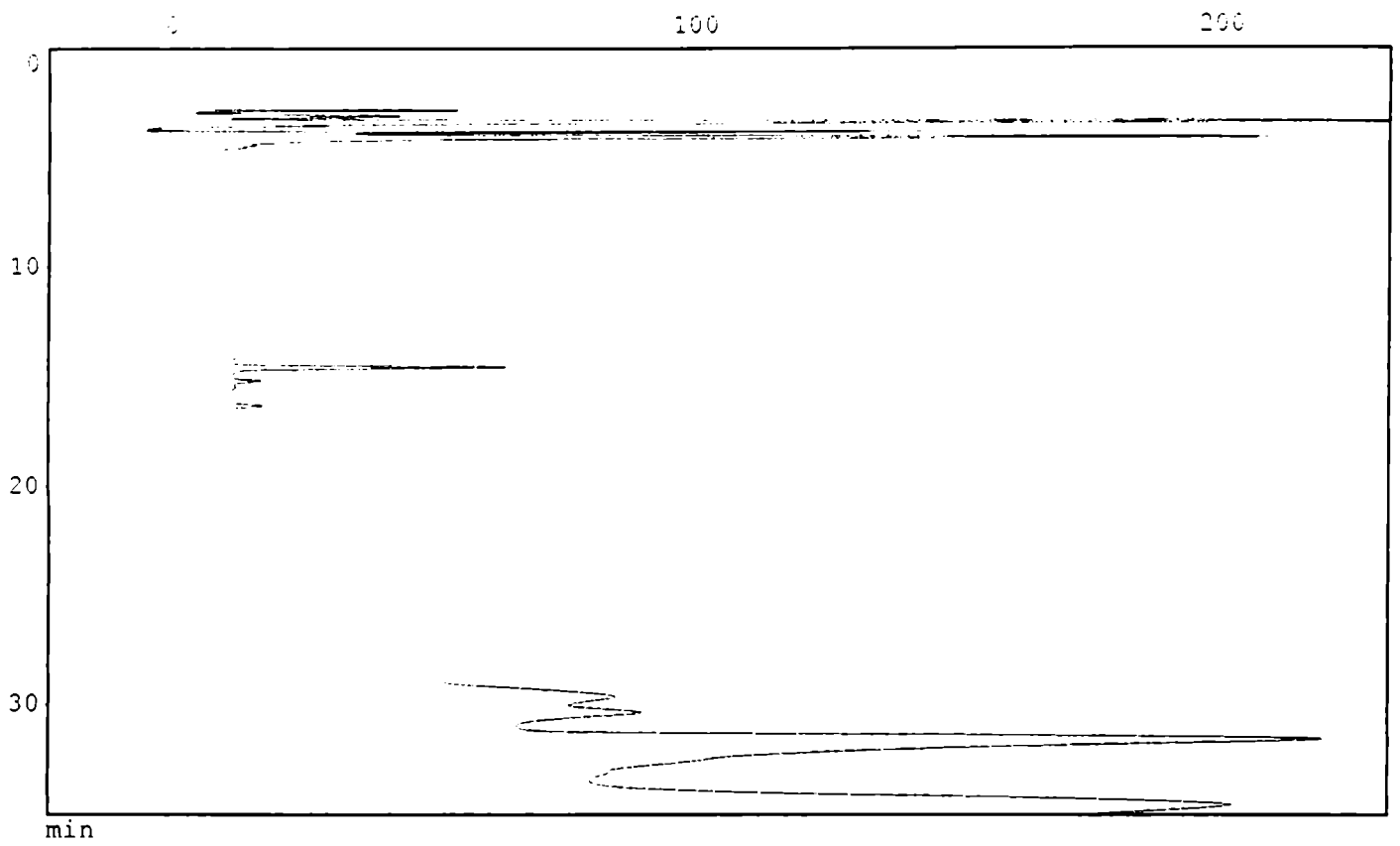


NS - CRUDA - 2 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 40)

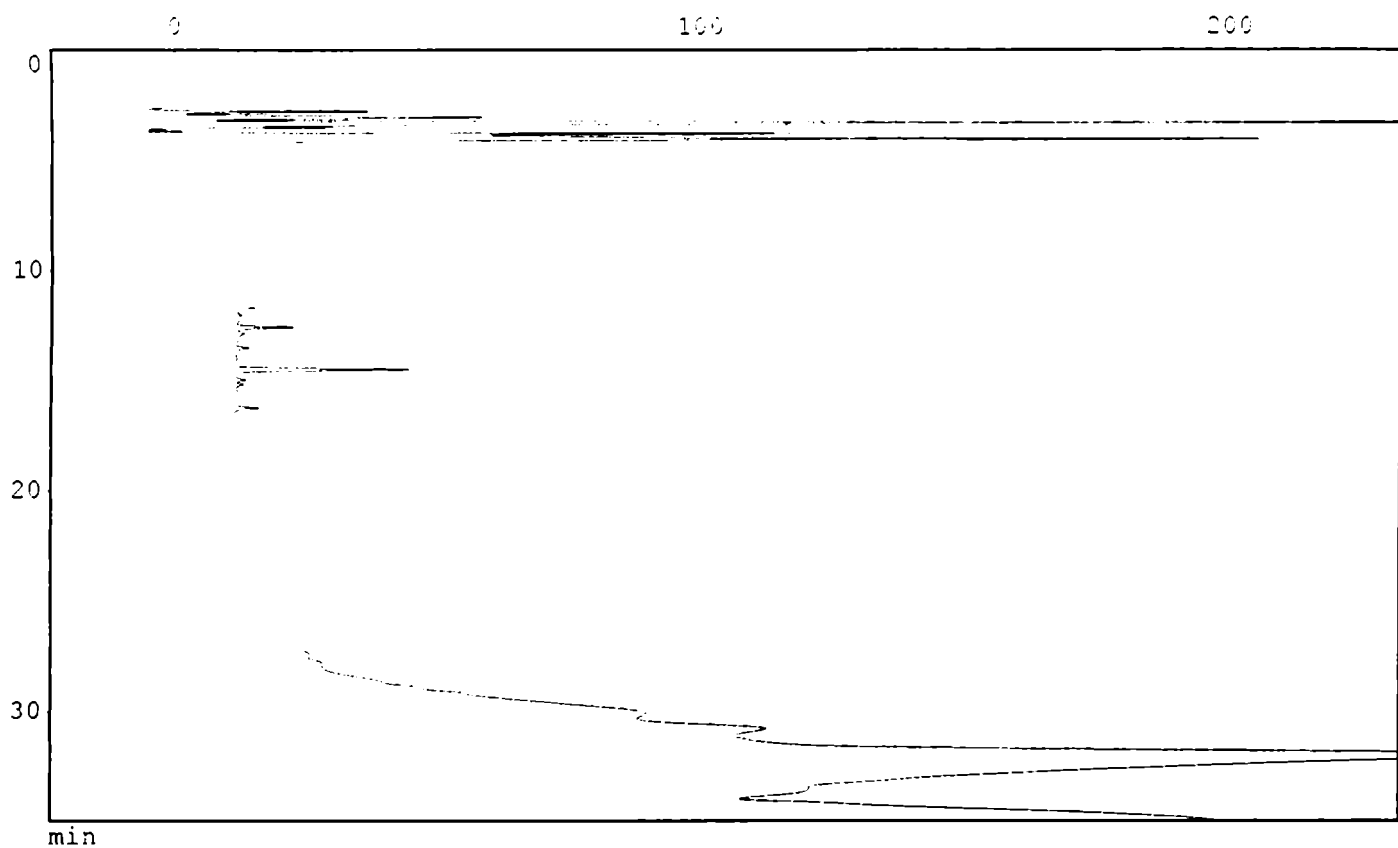
*** Chromatogram ***



NS - CRUDA - 2 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 41)

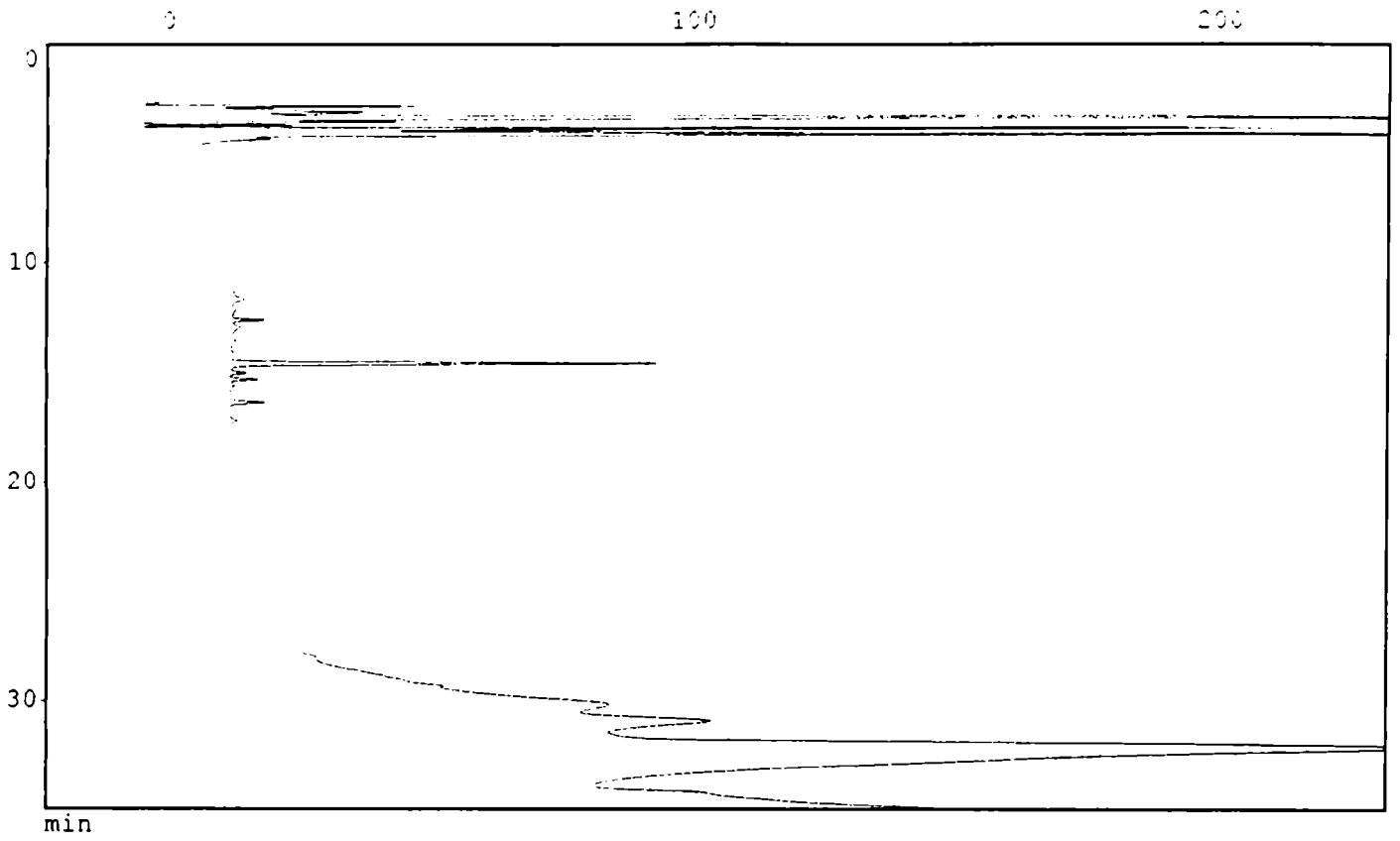


NS - CRUDA - 6 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 37)

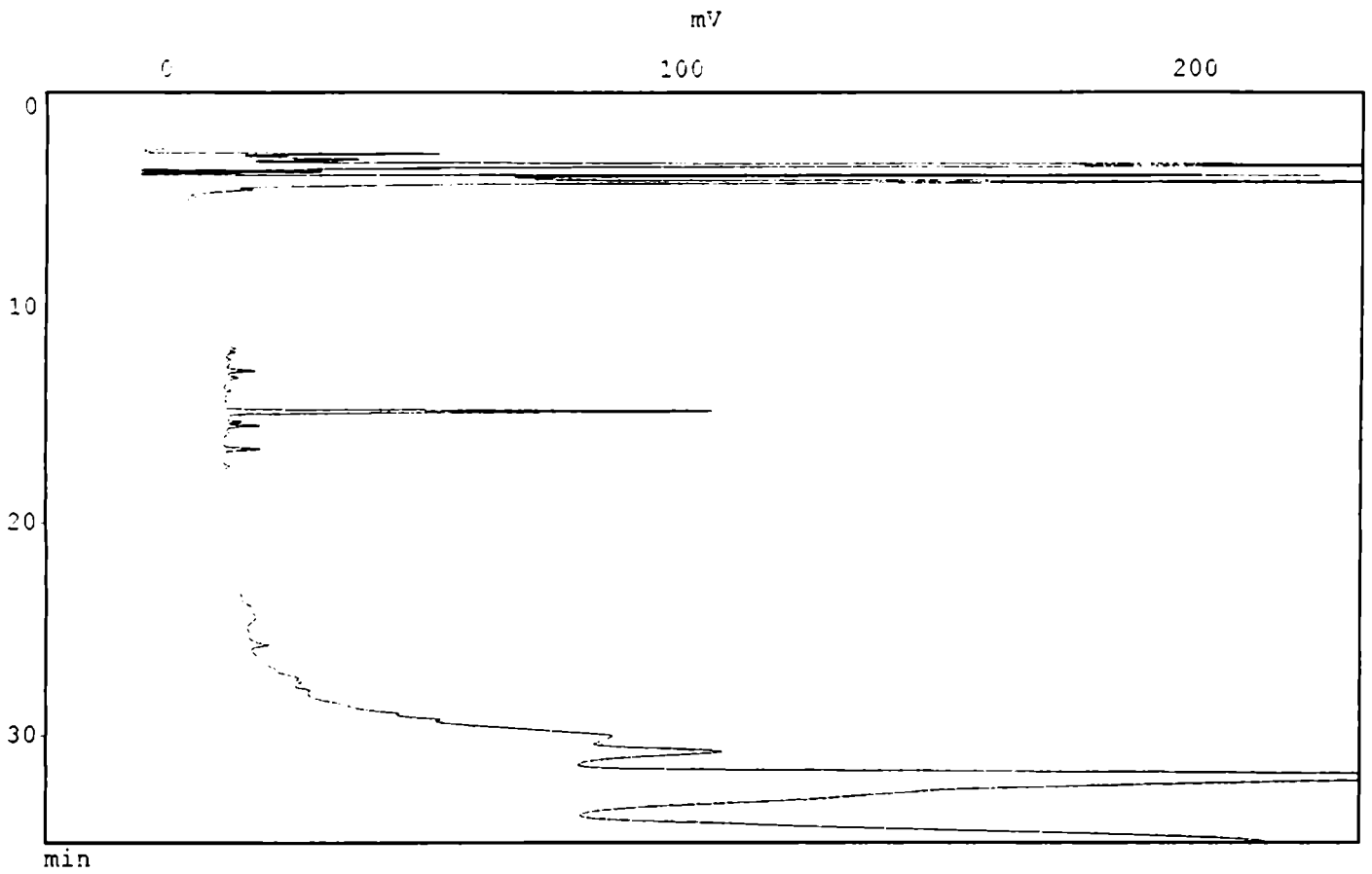


NS - CRUDA - 6 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 38)

*** Chromatogram ***

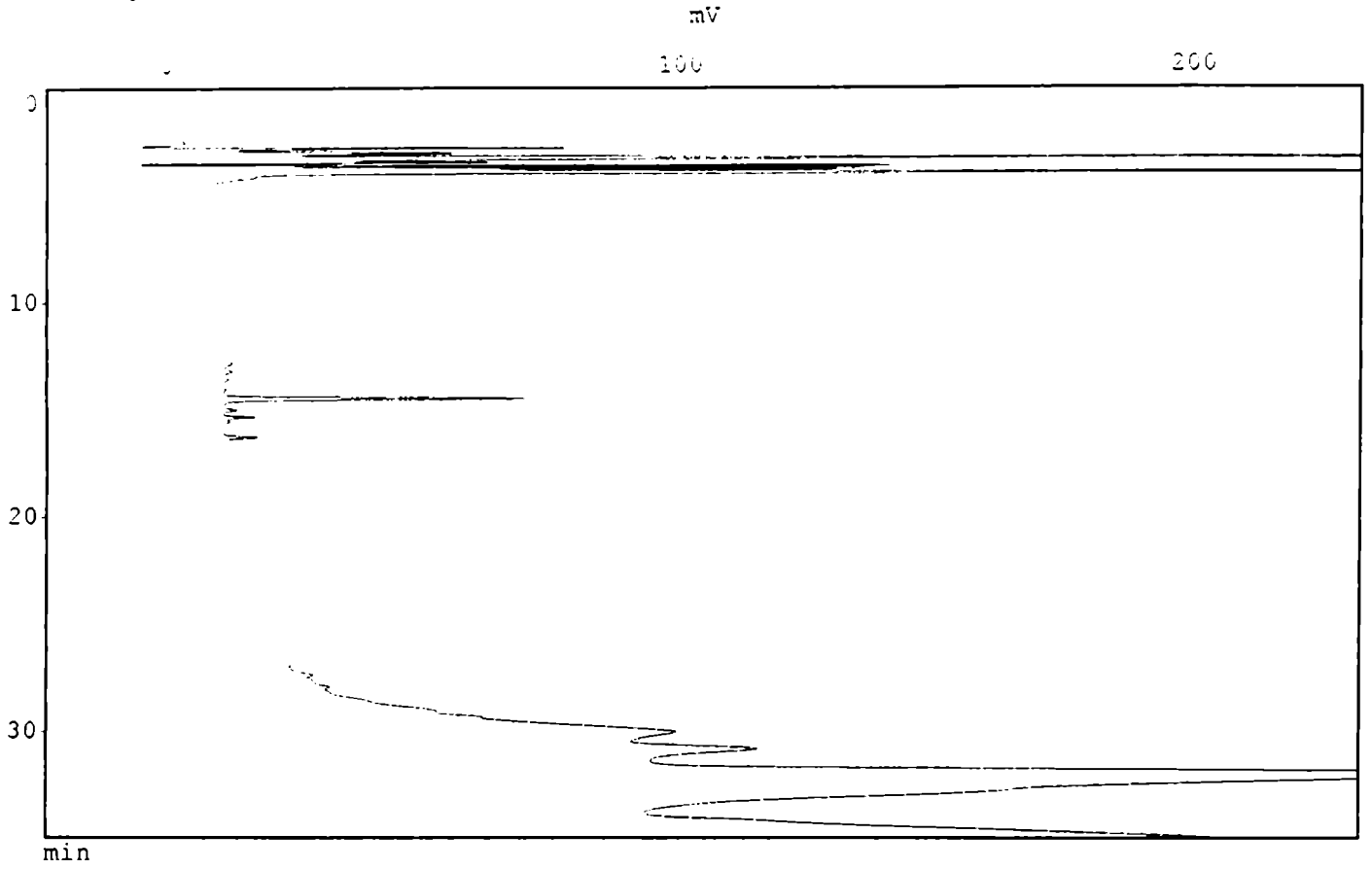


NS - CRUDA - 6 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 39)



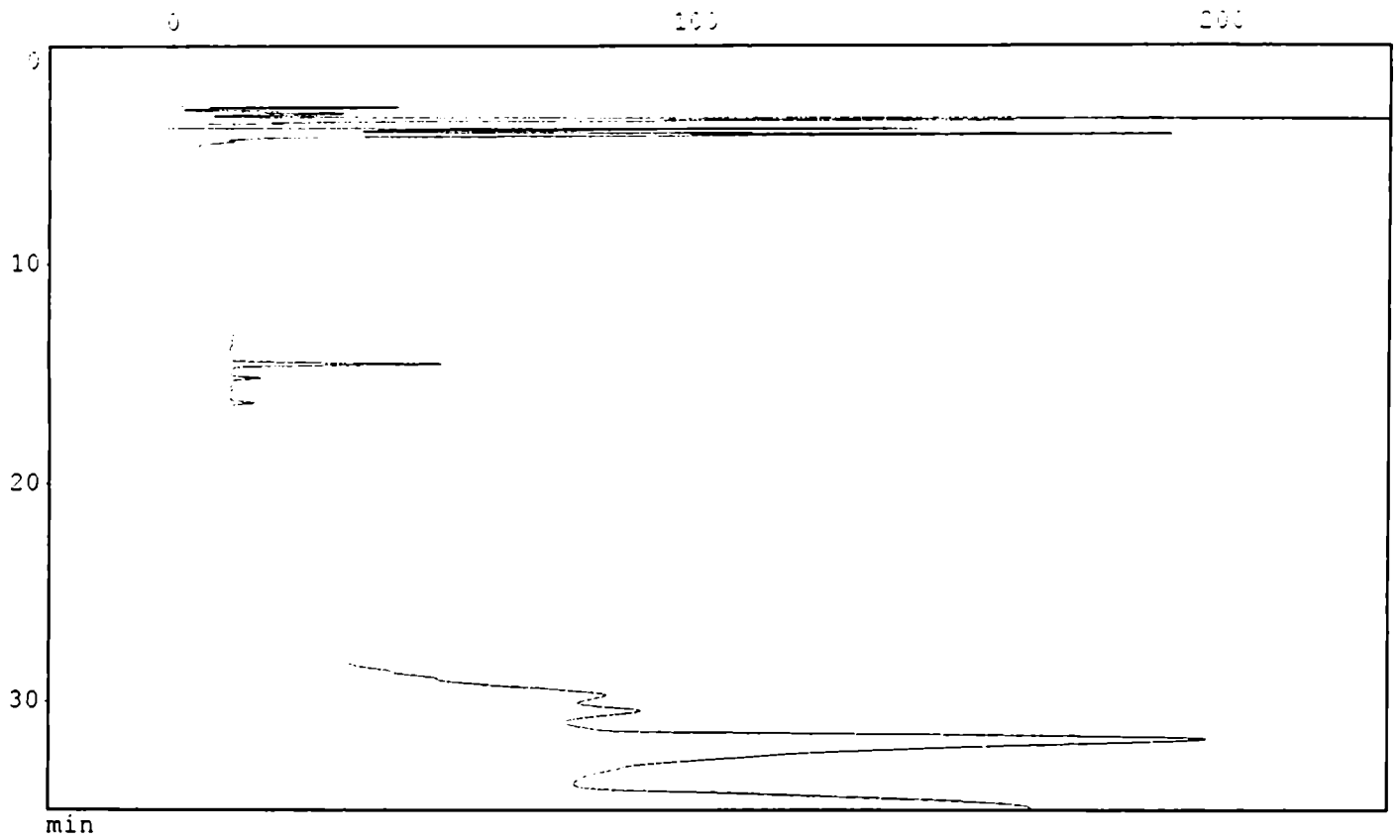
NS - CRUDA - 6 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 40)

Chromatogram

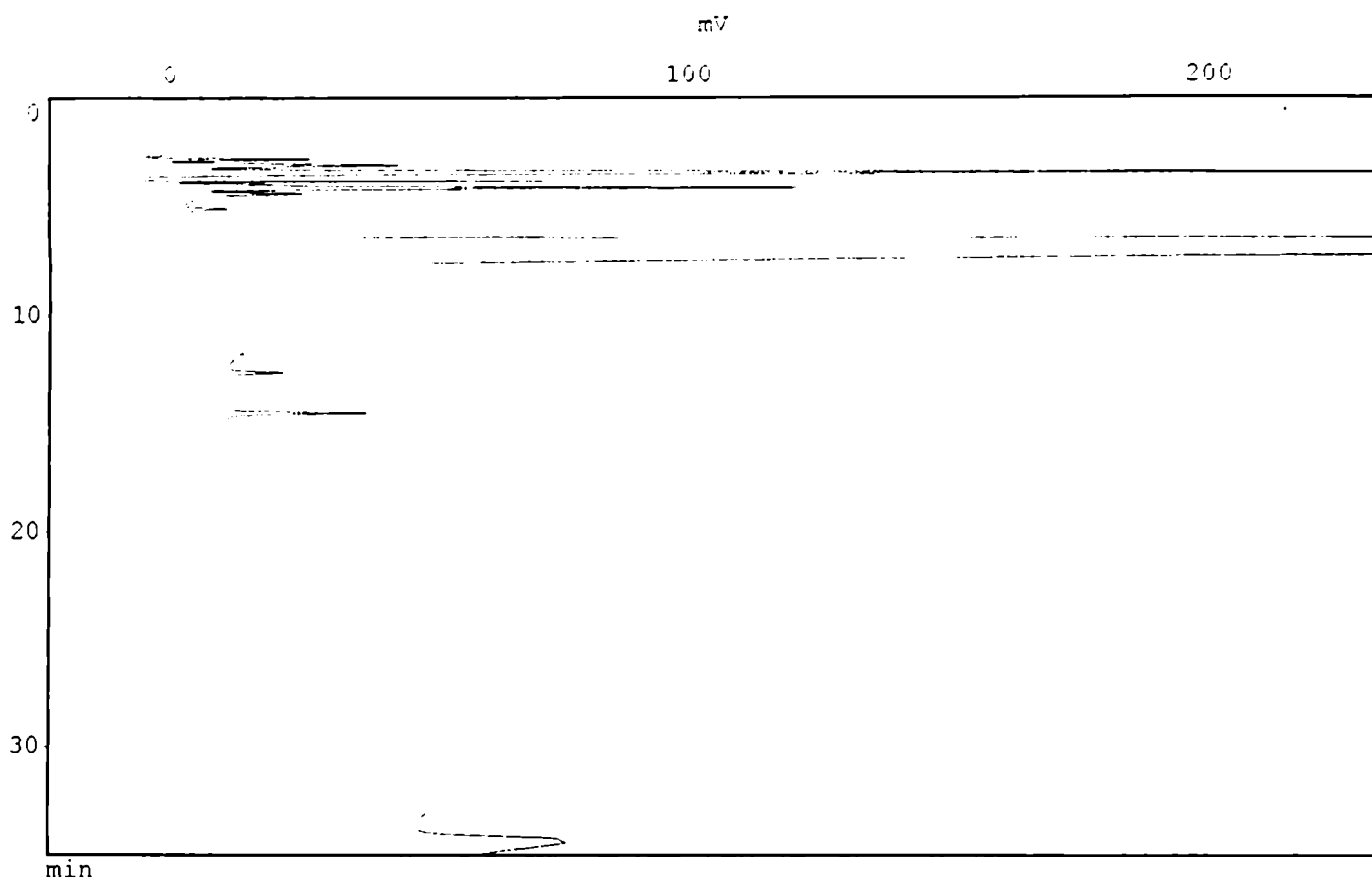


NS - CRUDA - 6 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 41)

Chromatogram ***

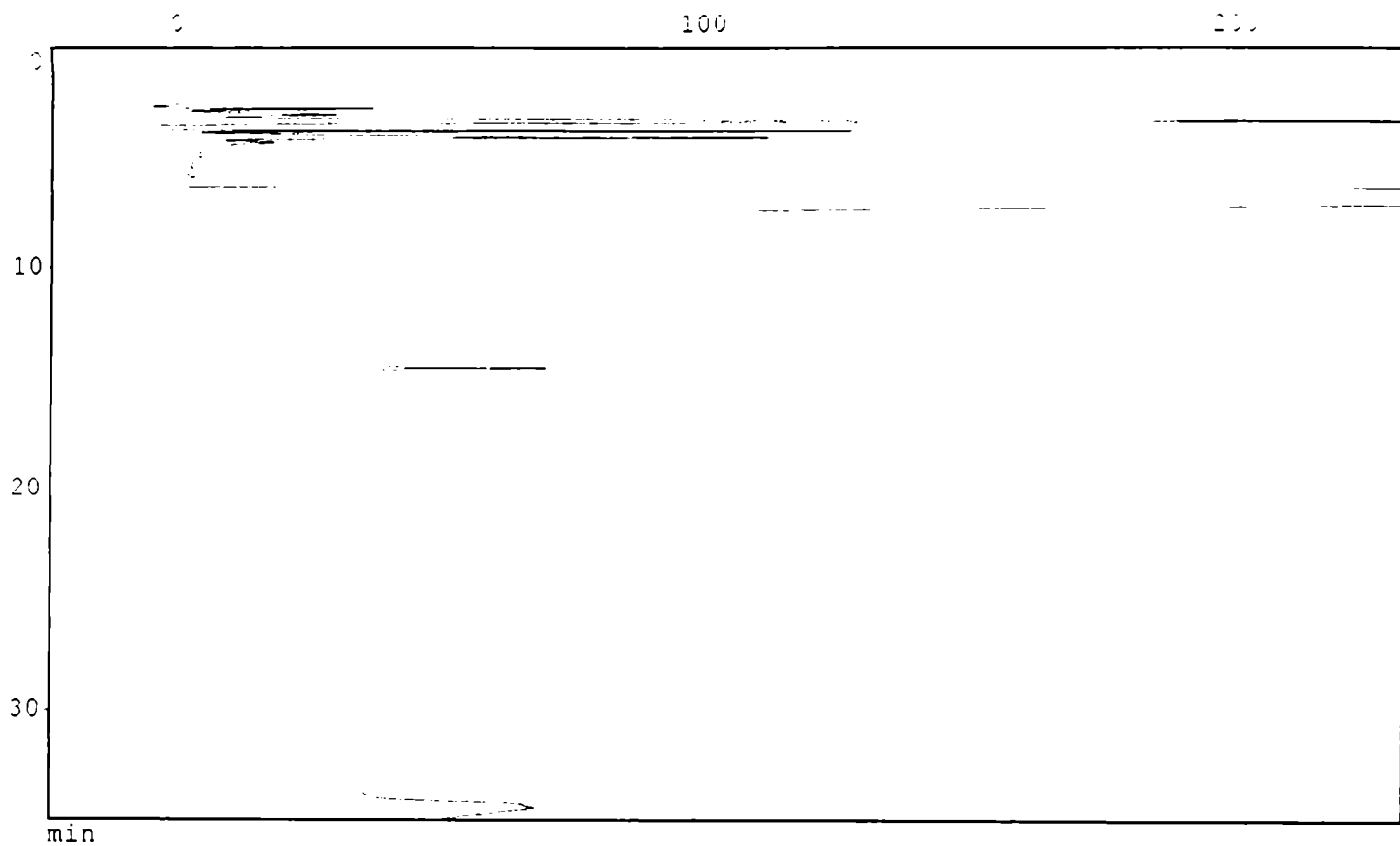


NNP - CRUDA - 2 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 37)



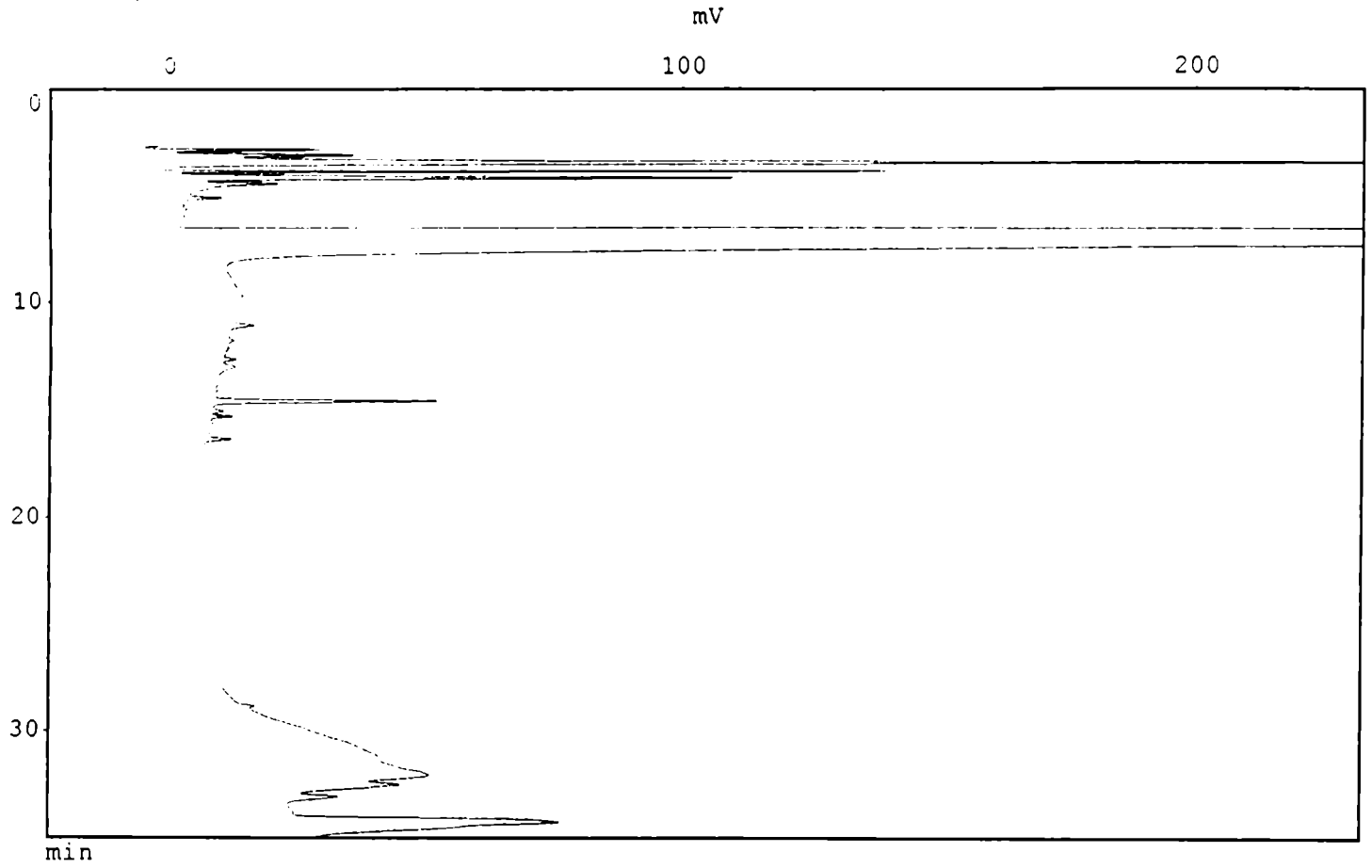
NNP - CRUDA - 2 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 38)

Chromatogram ***

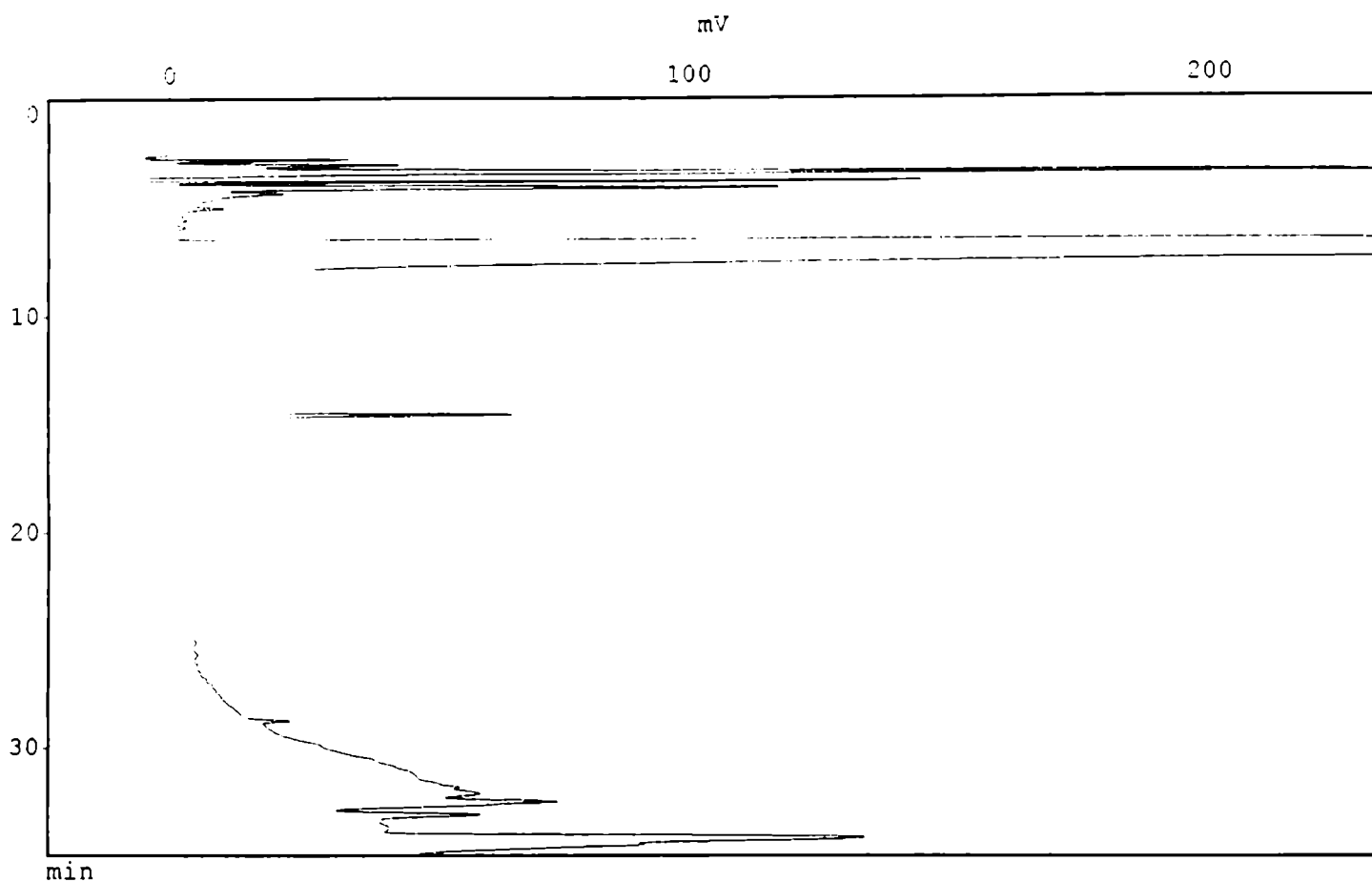


NNP - CRUDA - 2 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 40)

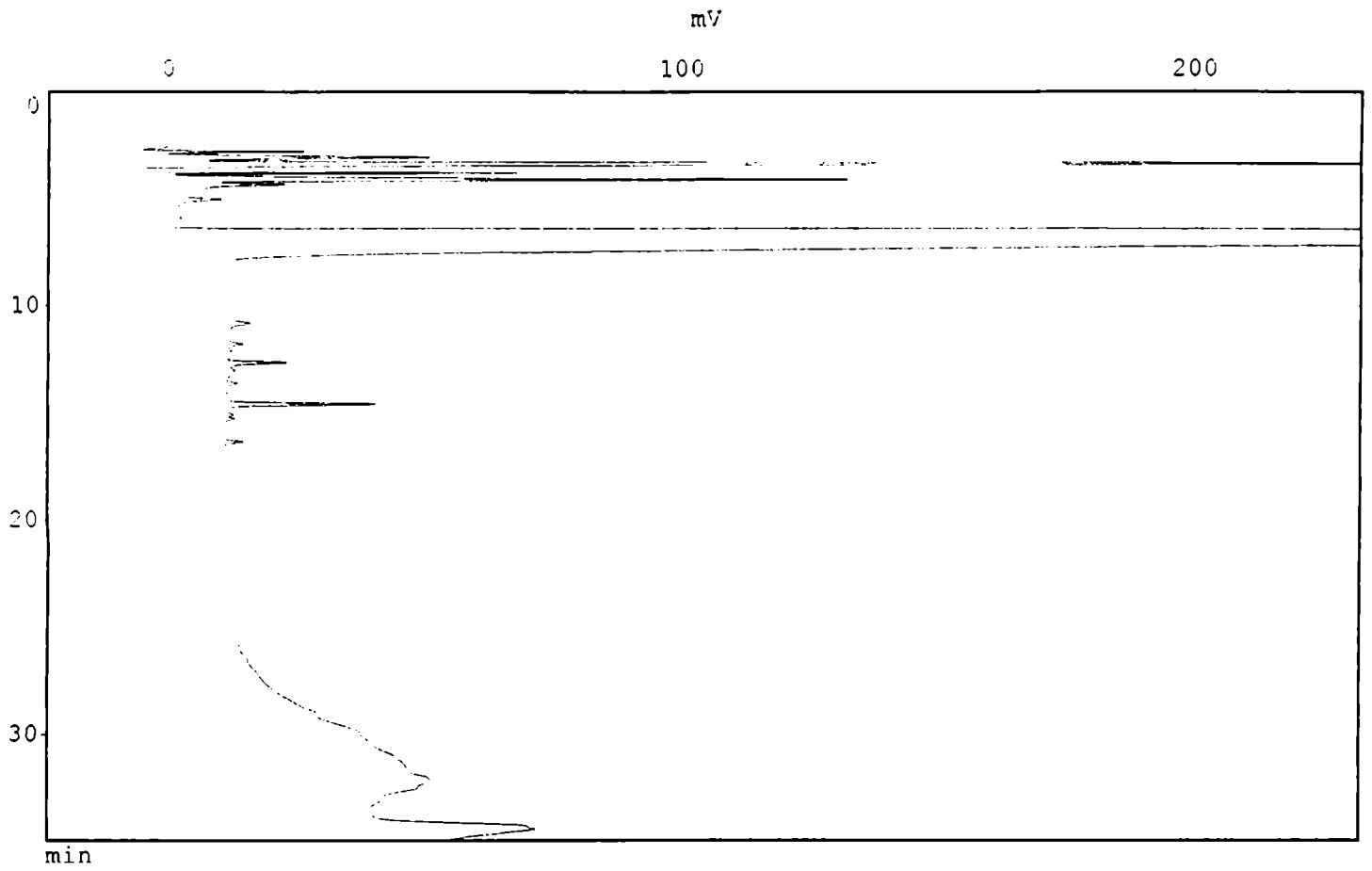
* Chromatogram ***



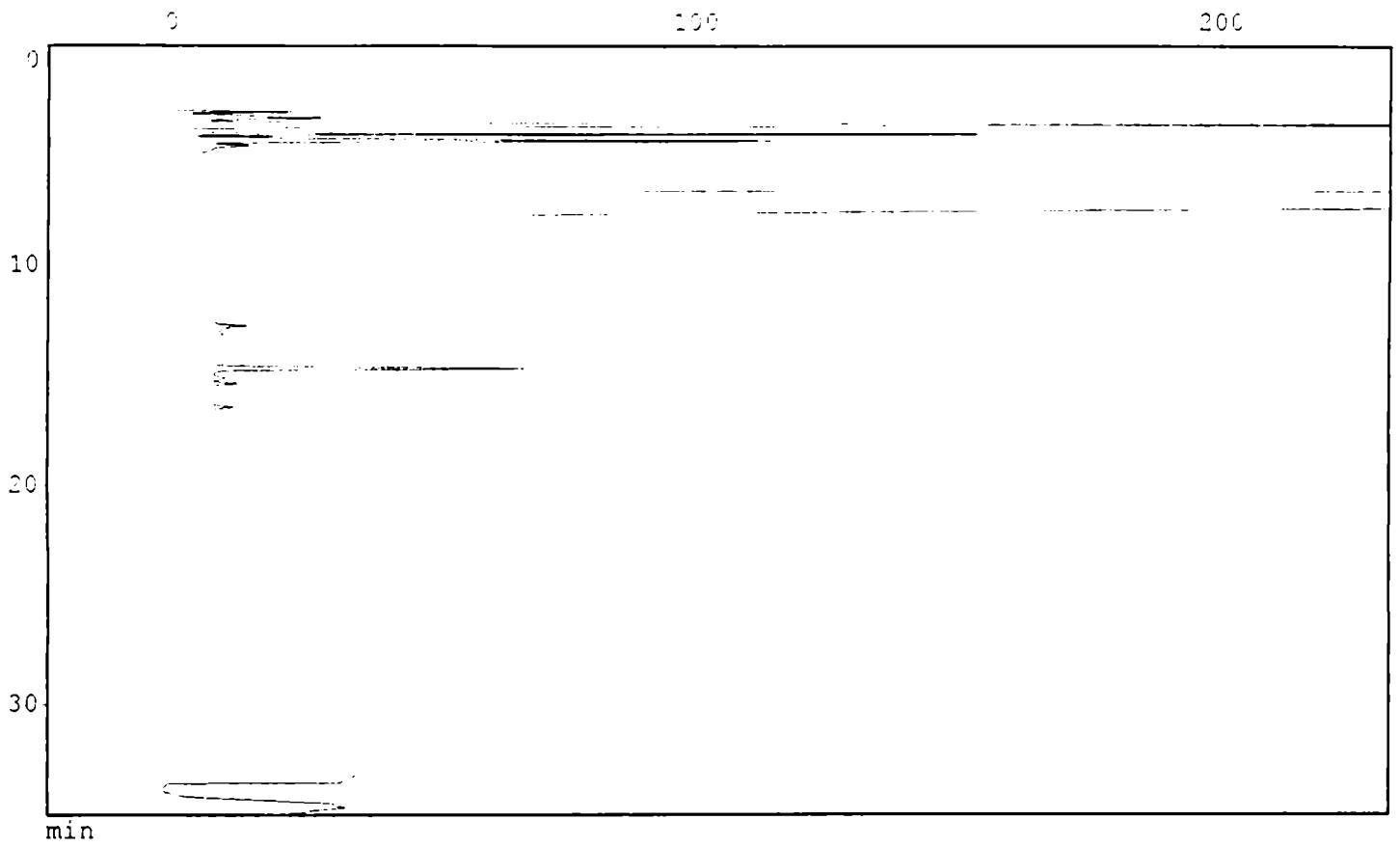
NNP - CRUDA - 2 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 41)



NNP - CRUDA - 6 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 37)

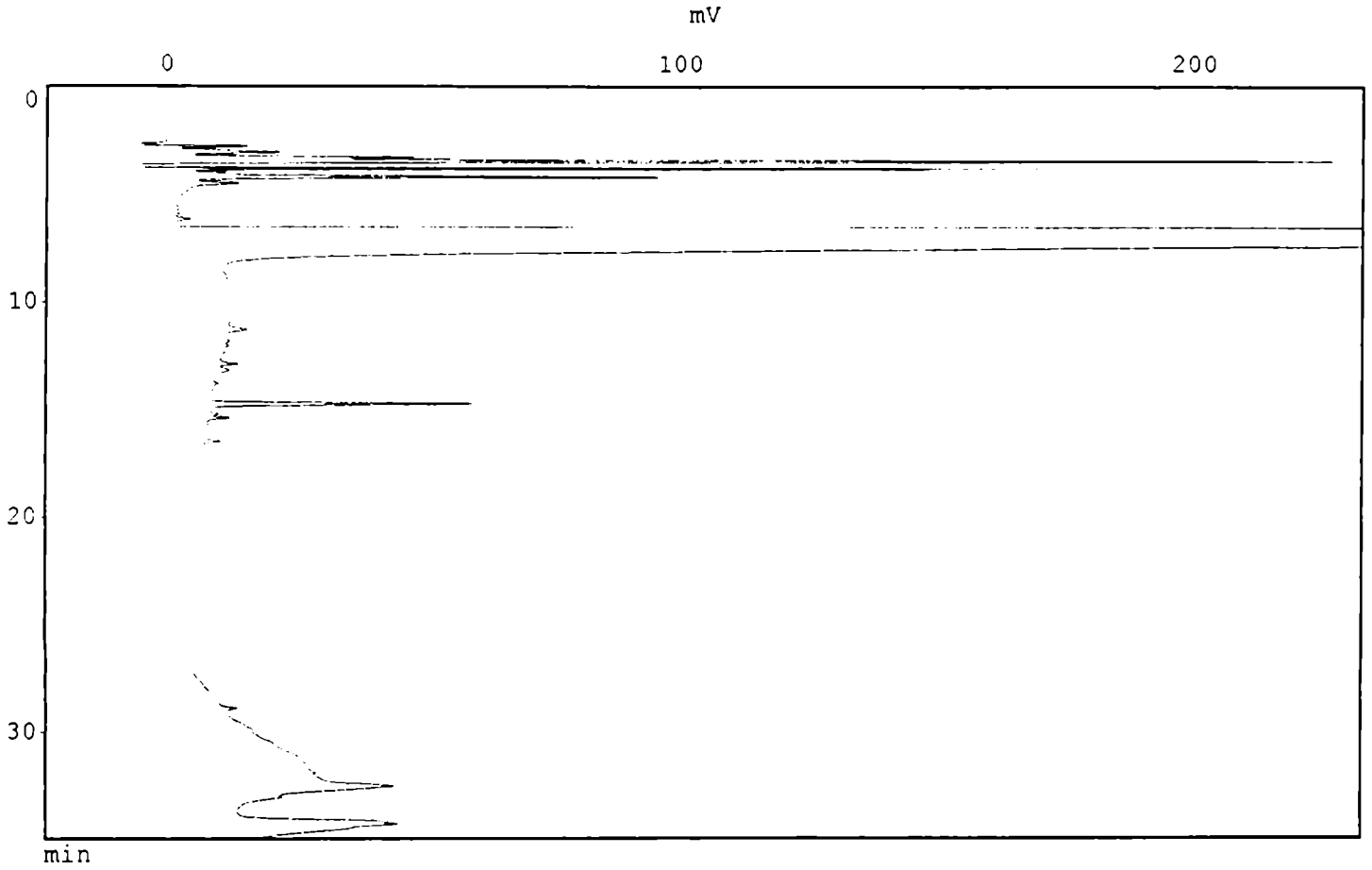


NNP - CRUDA - 6 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 38)

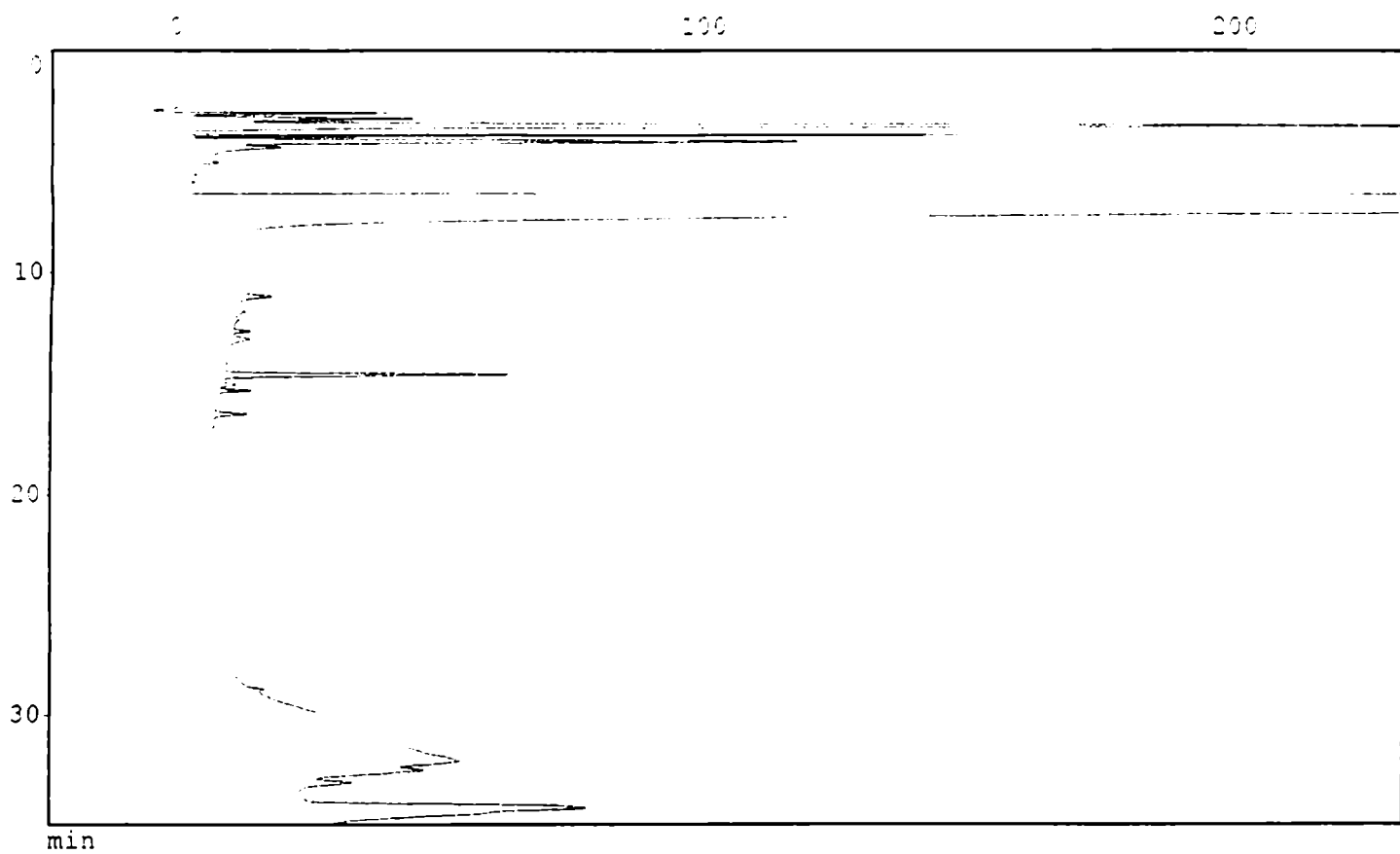


NNP - CRUDA - 6 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 39)

* Chromatogram ***



NNP - CRUDA - 6 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 40)



NNP - CRUDA - 6 DÍAS DE REFRIGERACION (MUESTRA 41)

Chromatogram ***

