



UNIVERSIDAD NACIONAL  
DEL LITORAL

## **UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

### **FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del grado académico de Magíster en Ciencias y Tecnología de los Alimentos.

**En el campo de: Ciencia y Tecnología de los Alimentos**

**“EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE CALCIO Y FÓSFORO EN QUESOS BLANDOS COMERCIALES. ESTUDIO DE PARÁMETROS TECNOLÓGICOS QUE DEFINEN LA CONCENTRACIÓN DE LOS MISMOS EN EL QUESO”**

Realizada en el Instituto de Lactología Industrial y la Asignatura Química Analítica de la Facultad de Ingeniería Química (U.N.L.).

**Autor: Lic. María Del Carmen Pedro**

**Director: Ing. Carlos Meinardi**

**Co-Director: Dra. María Alejandra Maine**

**Miembros del Jurado: Dr. Ángel Fusco.**

**Ing. Horacio Beldoménico.**

**Ing. Oscar Andrich.**

Año 2012

## Agradecimientos

Agradezco a todas aquellas personas que de alguna manera u otra me alentaron y ayudaron a terminar mi tesis:

A mi director Ing. Carlos Meinardi por su esfuerzo, dedicación y por haberme brindado todo su apoyo y conocimientos.

A mi Co-Directora Dra. Alejandra Maine, por alentarme a seguir, por su tiempo y dedicación.

Agradezco también a Sandra y Gabriela, compañeras y amigas ya que sin su desinteresada colaboración y permanente aliento, no lo hubiera logrado.

A Hernán, Mercedes, Gisela, “los chicos del otro lado”, que también colaboraron.

No me quiero olvidar de Cecilia, el Negro, Mimi, Susana, compañeros de otra época muy linda, a los que también tengo que agradecer.

Al Mg. Mario Candiotti y Lic Susana Palma por su valiosa colaboración durante el desarrollo de la tesis

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado a la evaluación del presente trabajo

A mis amigos Silvia y Mario por acompañarme.

Y por supuesto a mi familia: hermanos, sobrinos y sobretodo a mis hijos Santiago y Valentín por el aguante.

## Resumen

La leche es un alimento de alto valor biológico. Su riqueza, en proteínas, vitaminas y minerales lo hacen muy importante en la dieta de los seres humanos.

La fracción mineral se considera de gran importancia tanto desde el punto de vista nutricional como tecnológico. Más del 90% del calcio y el fósforo forma parte del esqueleto, además de participar de otras funciones importantes de organismo.

La fuente fundamental de Calcio y fósforo del organismo es la dieta. De allí la importancia de los productos lácteos.

El queso es una antigua forma de conservación de las proteínas y los minerales más importante de la leche por lo que siempre a sido motivo de estudio la elaboración del mismo y la mejor conservación de estos nutrientes.

El presente trabajo buscó seleccionar una metodología de análisis para estudiar la composición mineral de queso blando que se comercializan en nuestro país y estudiar, en elaboraciones a escala laboratorio de queso Cremoso la influencia de, la acidez desarrollada en la leche, el agregado del cloruro de calcio, la cantidad de fermento y la temperatura de pasteurización en la composición mineral del queso.

En una primera etapa se buscaron las técnicas apropiadas para la determinación de calcio y fósforo fueron probadas en quesos comerciales del tipo blando argentino.

Luego se elaboraron quesos tipo blando a escala piloto, a fin de poder estudiar la influencia de varios parámetros tecnológicos, para lo cual se planificó un

esquema de trabajo que consistió, en la elaboración de cinco quesos por tanda, cuatro quesos experimentales y uno testigo. Cada etapa se repitió cuatro veces.

A la leche de elaboración se le controló en todos los casos, su composición físico química.

Durante la elaboración se tomaron los pH de la leche en tina, en la cuajada en el momento del moldeo y en el ingreso a la salmuera. En los sueros se controló la concentración de calcio y el pH

Sobre el queso al final de la maduración se le realizaron las determinaciones de pH, humedad, rendimiento, concentración de calcio y fósforo. Sobre la concentración mineral se realizó tratamiento estadístico.

Se seleccionaron dos técnicas, de todas las propuestas por la bibliografía, para la determinación de calcio: Absorción Atómica y Electrodo selectivo de calcio. De estas dos fue seleccionada la del electrodo selectivo por ser el más conveniente para las industrias lácteas.

En los quesos comerciales analizados, se halló diferencia en la concentración de calcio y fósforo para las distintas empresas e incluso algunas de ellas tuvieron diferencias importante entre cada muestreo, pero en todos los casos la relación Ca/P estuvo entre los valores óptimos.

De la influencia de los parámetros estudiados sobre la concentración de calcio y fósforo en los quesos elaborados a escala laboratorio, se concluyó que:

- El agregado de  $\text{CaCl}_2$  en la leche de elaboración, favorece el incremento del contenido de calcio y fósforo en quesos. Cuando este agregado es elevado (mayor a  $0,4\text{g CaCl}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ), el exceso se pierde en suero, De dicho análisis, también queda evidenciado que el agregado de una alta concentración de

fermento de adición directa en tina, afecta negativamente en la retención de los minerales estudiados.

- El empleo de leche con acidez desarrollada reduce la concentración de calcio en el queso, pero en el rango estudiado, no afecta la concentración de fósforo.
- Todo tratamiento térmico a temperatura superior a la de pasteurización, incrementa el rendimiento quesero, pero afecta negativamente en la retención de calcio y fósforo en los quesos.
- La relación Ca/P oscila en un rango más amplio en quesos elaborados a escala piloto, si los comparamos con los quesos comerciales elaborados.

## ÍNDICE

<b>1- Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1.1 -La leche y sus atributos</b>	<b>1</b>
<b>1.2 -Proteínas de la leche</b>	<b>2</b>
1.2.1 -Composición de la caseína	<b>3</b>
1.2.2 -Mecanismo de coagulación de la caseína por vía enzimática	<b>6</b>
<b>1.3 -Requerimiento de calcio y fósforo en el organismo</b>	<b>7</b>
<b>1.4 -Relación calcio fósforo en los alimentos</b>	<b>10</b>
<b>1.5 -Datos estadísticos sobre producción y consumo de lácteos en Argentina</b>	<b>12</b>
1.5.1 -Producción láctea argentina	<b>12</b>
1.5.2 -Producción nacional de quesos.	<b>14</b>
1.5.3 -Consumo nacional de quesos.	<b>15</b>
<b>1.6 -El queso y sus ventajas.</b>	<b>16</b>
<b>1.7 -Quesos argentinos de pasta blanda</b>	<b>18</b>
<b>1.8 -Características generales y tecnología de elaboración del Queso Cremoso Argentino.</b>	<b>21</b>
1.8.1 -Elaboración de quesos. Características generales.	<b>21</b>
1.8.2 -Queso cremoso. Tecnología de elaboración	<b>22</b>
1.8.2.1 -Área de producción de queso cremoso en argentina	<b>22</b>
1.8.2.2 -Tecnología	<b>24</b>
1.8.3 -Composición porcentual de queso cremoso	<b>28</b>

<b>2 - Objetivos</b>	<b>29</b>
2.1 -Objetivo General	29
2.2 -Objetivo Específico.	29
<b>3 - Materiales y métodos.</b>	<b>31</b>
<b>3.1 -Determinaciones realizadas en quesos comerciales.</b>	<b>31</b>
3.1.1 -Muestreo y conservación de las muestras.	32
3.1.2 -Tratamiento de la muestra para la determinación de calcio y fósforo.	32
3.1.3 -Preselección de método para la determinación de Ca.	33
3.1.4 -Selección del método más conveniente para la determinación de calcio	34
3.1.5 -Determinación de calcio con electrodo selectivo	34
3.1.5.1 -Descripción del electrodo de estado líquido	34
3.1.5.2 -Efecto del pH en la determinación de calcio con el electrodo	36
3.1.5.3 -Curva de calibrado	37
3.1.6 -Determinación de fósforo por espectrofotometría UV-Visible	37
3.1.7 -Determinación de pH	38
3.1.8 -Humedad.	38
<b>3.2- Quesos elaborados en planta piloto.</b>	<b>39</b>
3.2.1 -Materia prima	39
3.2.2 -Equipos utilizados en la elaboración.	39
3.2.3 -Esquema de elaboración de quesos experimentales.	41
3.2.4 -Elaboración de quesos experimentales	46
3.2.5 -Determinaciones Analíticas	50
3.2.5.1 -Determinaciones realizadas sobre la leche y durante el	

proceso de elaboración	<b>50</b>
3.2.5.1.1 -pH y acidez Dornic.	<b>50</b>
3.2.5.1.2 -Materia grasa	<b>51</b>
3.2.5.1.3 -Nitrógeno total (NT)	<b>51</b>
3.2.5.1.4 -Determinación del contenido de caseína	<b>53</b>
3.2.5.1.5 -Determinación de Sólidos Totales	<b>53</b>
3.2.5.1.6 -Determinación de pH de coagulación	<b>54</b>
3.2.5.1.7 -Determinación de pH en la cuajada en el momento del moldeo y en el ingreso a la salmuera.	<b>54</b>
3.2.5.1.8 -Determinación de pH en suero de moldeo	<b>55</b>
3.2.5.1.9 -Determinación de calcio en sueros con electrodo selectivo de calcio.	<b>55</b>
3.2.5.2. Determinaciones realizadas en el queso al final de la maduración.	<b>56</b>
3.2.5.2.1 -Muestreo y conservación de la muestra.	<b>56</b>
3.2.5.2.2 -Determinación de pH.	<b>56</b>
3.2.5.2.3 -Determinación de humedad.	<b>56</b>
3.2.5.2.4 -Tratamiento de la muestra para las determinaciones de calcio y fósforo	<b>56</b>
3.2.5.2.5 -Determinación de calcio con electrodo selectivo de calcio.	<b>56</b>
3.2.5.2.6 -Determinación de fósforo	<b>57</b>
<b>4 - Resultados y discusión</b>	<b>58</b>
<b>4.1- Determinaciones realizadas en quesos comerciales.</b>	<b>58</b>
4.1.1 -Preselección de método para la determinación de calcio	<b>58</b>
4.1.2 -Selección del método más conveniente para la determinación	

de calcio.	<b>59</b>
4.1.3 -Determinaciones de calcio en quesos comerciales realizadas con el electrodo selectivo.	<b>61</b>
4.1.3.1 -Primera tanda	<b>62</b>
4.1.3.2 -Segunda tanda	<b>63</b>
4.1.4 -Determinación de fósforo por espectrofotometría U.V.-Visible.	<b>64</b>
4.1.4.1 -Primera tanda	<b>65</b>
4.1.4.2 -Segunda tanda	<b>66</b>
4.1.5 -Relación calcio fósforo	<b>67</b>
4.1.6-Determinación de pH	<b>68</b>
4.1.7- Determinación de humedad	<b>69</b>
<b>4.2 -Materia prima: Composición química de la leche utilizada en las elaboraciones</b>	<b>70</b>
<b>4.3 -Determinaciones realizadas</b>	<b>71</b>
<b>4.3.1 -Determinaciones realizadas durante la elaboración.</b>	<b>71</b>
4.3.1.1 -Determinación de pH de la leche en tina.	<b>71</b>
4.3.1.2 -Determinación de pH en cuajada al momento de su ingreso al molde.	<b>72</b>
4.3.1.3 -Determinación de pH en cuajada al momento de su ingreso a salmuera.	<b>73</b>
4.3.1.4 -Determinación de pH en sueros	<b>75</b>
4.3.1.5 -Determinación de calcio en suero	<b>76</b>

<b>4.3.2 -Determinaciones Realizadas sobre el queso al final de la maduración.</b>	
<b>78</b>	
4.3.2.1 -Determinación de pH	<b>78</b>
4.3.2.2 -Humedad.	<b>79</b>
4.3.2.3 -Rendimiento	<b>80</b>
4.3.2.4 -Determinación de calcio	<b>82</b>
4.3.2.4.1 -Primera elaboración.	<b>82</b>
4.3.2.4.2 -Segunda elaboración.	<b>83</b>
4.3.2.4.3 -Tercera elaboración	<b>84</b>
4.3.2.4.4 -Cuarta elaboración.	<b>85</b>
4.3.2.4.5 -Análisis de los resultados de calcio	<b>85</b>
4.3.2.5. Determinación de fósforo	<b>89</b>
4.3.2.5.1 -Primera elaboración	<b>89</b>
4.3.2.5.2 - Segunda elaboración	<b>90</b>
4.3.2.5.3- Tercera elaboración	<b>91</b>
4.3.2.5.4 -Cuarta elaboración	<b>92</b>
4.3.2.5.5 -Análisis de los resultados de fósforo	<b>93</b>
4.3.2.6 -Relación calcio fósforo	<b>95</b>
<b>5 - Conclusiones.</b>	<b>97</b>
<b>Anexo</b>	<b>99</b>
<b>Referencias bibliográficas</b>	<b>113</b>

## **1- INTRODUCCIÓN**

### **1-1 La leche y sus atributos**

La leche, sin ser un alimento completo, tiene cualidades nutritivas excepcionales. Su riqueza, en proteínas, vitaminas y minerales (calcio, fósforo, etc.), la hacen un componente importante en la dieta de los seres humanos a lo largo de toda su vida. Las proteínas de la leche se adecuan muy bien a las necesidades humanas y por lo tanto se consideran de alta calidad. El valor biológico de la proteína de la leche cruda es 0,9, respecto al máximo de 1,0 asignado a la proteína del huevo entero. Las proteínas de la leche son ligeramente deficientes en los aminoácidos sulfurados metionina y cisteína, haciendo que el valor biológico sea ligeramente inferior al óptimo ideal. (3)

Los requerimientos de calcio en el niño y el anciano están bien cubiertos por la leche. Esto se debe a que el calcio se encuentra en la leche en alta concentración y tiene buena biodisponibilidad (del 25 al 50 %) atribuible a la proporción ideal en la que se encuentra con el fósforo ( $Ca / P = 1,4$ ) y a que la absorción intestinal se ve favorecida por la presencia de vitamina D, proteínas y lactosa. (1).

Actualmente se cree que las reservas de calcio en el organismo se forman fundamentalmente en la adolescencia y en la juventud, y que cuando más importante son, más se retrasa la aparición de fenómenos de osteoporosis.

Por otra parte la leche es tolerada por todos los niños ya que la lactasa (enzima que hidroliza la lactosa en glucosa y galactosa) es la única disacaridasa que aparece durante el desarrollo fetal, independientemente del origen étnico. Quedan excluidos aquellos infantes que por defectos congénitos no producen lactasa o sufren de intolerancia o alergia hacia algún componente de la leche. UNICEF y otras agencias

involucradas con la alimentación suplementaria, en los países en desarrollo nunca han encontrado poblaciones de niños preescolares o escolares que no acepten un vaso de leche por intolerancia a la lactosa. (2).

Un porcentaje elevado de las poblaciones africanas y asiáticas producen menos  $\beta$  galactosidasa intestinal, en consecuencia, la indigestión de la lactosa se encuentra más frecuentemente en esas poblaciones. La deficiencia de lactasa suele ser parcial y no total, por lo que no es poco frecuente encontrar individuos calificados como intolerantes a la lactosa que puedan consumir un vaso de leche de 240 ml. Sin embargo, un porcentaje significativo de la población se beneficia si previamente al consumo de la leche se hidroliza la lactosa. Industrialmente esto se ha desarrollado usando lactasa microbiana soluble o inmovilizada. (3)

Por otro lado en aquellos casos con intolerancia a la lactosa deberá tenerse en cuenta el consumo de productos lácteos bajos en lactosa que pueden sustituir parcial o totalmente a la leche fluida, por ejemplo, el queso o el yogur.

## **1.2- Proteínas de la leche**

La elaboración de queso es seguramente la forma más antigua de procesado de la leche, con el fin de conservar su proteína que tan fácilmente se deteriora, dado su alto valor biológico, así como también su contenido en materia grasa y fundamentalmente mineral de calcio y fósforo, cuyas cualidades nutricionales son tan apreciadas.

En el mundo se encuentra una gran variedad de quesos que responden a las costumbres, la naturaleza de la leche y la tecnología empleada.

Los diferentes procedimientos de fabricación del queso, que implican una serie de transformaciones bioquímicas, hacen que, en un principio la insípida caseína adquiera un sabor agradable y característico para cada tipo de queso.

Las proteínas características de la leche están compuestas por las caseínas ( $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\kappa$ ) y las proteínas del suero( Lactoalbúmina y  $\beta$  Lactoglobulina.entre otras).

Las caseínas están en disolución coloidal encontrándose estables y homogéneamente dispersas en la leche, estas se han de aglomerar o flocular en el proceso de coagulación, formando un gel. (4)

La coagulación puede realizarse empleando ácidos (empleada para elaboración de leches ácidas) o empleando enzimas (coagulación enzimática).

La elaboración de la mayoría de los quesos se basa en la coagulación enzimática de la leche. (5)

### **1.2.1- Composición de la caseína**

La micela de caseína es una partícula esférica, formada por la asociación de diferentes caseínas y de componentes salinos de los cuales los dos principales son el calcio y el fósforo. La composición media de la micela de caseína, se ve en la tabla 1-I.

Tabla 1-I: composición media de la micela de caseína en g. 100g<sup>-1</sup>

Caseínas		Componentes salinos	
$\alpha S_1$	33	Calcio	2,9
$\alpha S_2$	11	Magnesio	0,2
$\beta$	33	Fosfato inorgánico	4,3
$\kappa$	11	citrato	0,5
$\gamma$	4		
Total caseínas	92	Total comp salinos	8,0

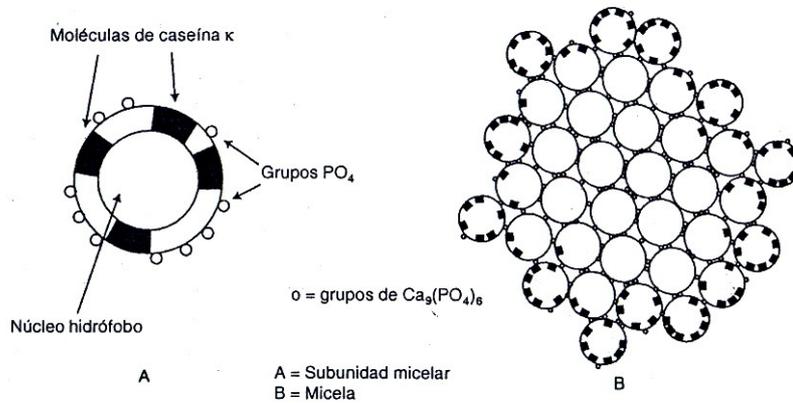
La bibliografía propone que la micela (fig 1-I) está formada de submicelas. Esta estructura, no es uniforme: tiene un núcleo hidrófobo formado por las partes apolares de las caseínas, y en la periferia están las partes polares hidrófilas, principalmente los residuos fosfóricos.

La agregación entre las submicelas (Fig 1-II) es favorecida por la presencia de sitios fosfoserilos que poseen afinidad por el calcio.

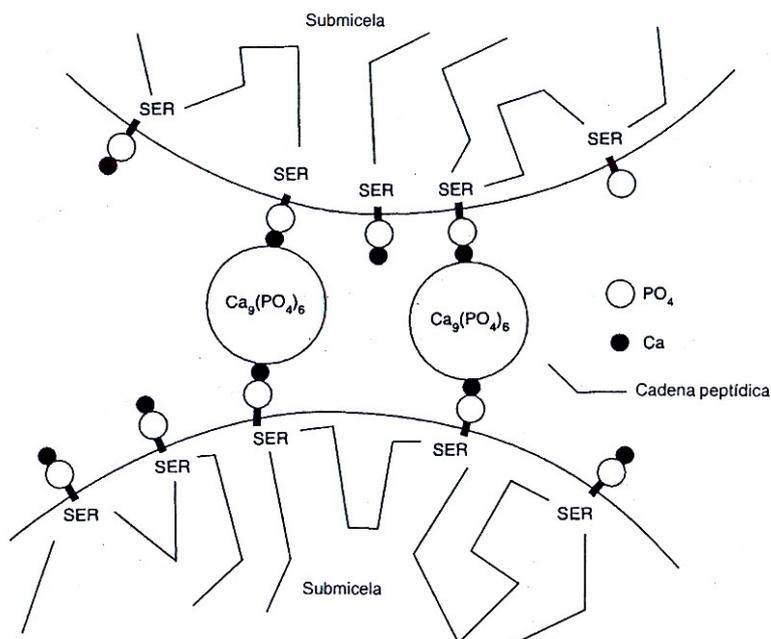
La proporción relativa de la caseína, sobre todo la caseína Kapa, varía según las submicelas. La caseína Kapa se encuentra predominantemente en la superficie de las micelas actuando de coloide protector, ya que esta fracción es insensible al calcio. La acción protectora se debe según Kirchmeier a que una parte de esta caseína (glicomacropéptidos) penetra en la fase acuosa de la leche, formando, por su carácter hidrófilo una capa de hidratación. El resto de la Kapa caseína es sensible al calcio y se encuentra como las demás fracciones de caseína, unida al calcio.

La capa de hidratación aloja, además, cargas eléctricas del mismo signo, lo que hace que las micelas de caseínas se repelan entre sí, quedando impedida la precipitación de la caseína.(4) (5)

**Figura 1-I Estructura de la submicela y micela de caseína**



**Figura 1-II: Esquema de la estructura tipo puente de dos submicelas por medio del fosfato de calcio**



**1.2.2- Mecanismo de coagulación de la caseína por vía enzimática**

En la mayoría de los quesos la elaboración comienza con la transformación de la leche del estado líquido al estado de gel por la acción de enzimas proteolíticas

( conocidas como coagulantes), casi siempre de origen animal.

Se distinguen tres fases:

- 1- Fase primaria o enzimática
- 2- Fase secundaria o de agregación de las micelas desestabilizadas.
- 3- Fase terciaria o fase de reticulación.

**Fase primaria:** es independiente de la concentración del ión calcio, se produce a baja temperatura (velocidad apreciable a 0°C),

En esta etapa se produce la hidrólisis de la caseína Kapa, en el ataque se pierde el grupo hidrofílico (glicomacropéptido).

Esto lleva a que las micelas de caseína no puedan solvatar agua y se inestabilicen, reaccionando con el ión calcio.

**Fase secundaria o coagulación propiamente dicha:** necesita una temperatura mayor a 10 °C y una concentración importante de ión calcio. Estos iones forman uniones salinas con las micelas de caseína, formando un gel que ocupa el mismo volumen que la leche líquida. Por lo tanto si la temperatura y el pH son el adecuado se forman, por la presencia de iones calcio, puentes salinos entre las micelas de caseína. La unión se produce con rapidez y esto provoca la coagulación de la leche.

**Fase terciaria:** Las micelas agregadas experimentan profundas reorganizaciones por la aparición de uniones fosfocálcicas y posiblemente por puentes disulfuro entre las paracaseínas. El gel que se forma resulta una estructura de red o panal tridimensional. A medida que el gel toma consistencia tiende a contraerse (sinéresis) y a eliminar suero.

Son muchos los factores que influyen en esta etapa, tales como, concentración de enzimas, la temperatura, el pH, el contenido de calcio, la composición en caseínas y los tratamientos previos de la leche. (5)

El complejo caseína –calcio que se encontraba en disolución coloidal se transforma, debido a este proceso de coagulación enzimática, sinéresis y desuerado, en una red de paracaseinato cálcico que se llama cuajada y es el que realmente se ha de convertir en la masa del queso.

Las enzimas coagulantes, aparte de la acción precipitante de la caseína, ejercen también una ligera acción proteolítica, en la etapa de maduración.(4)

### **1.3- Requerimiento de calcio y fósforo en el organismo**

La mayoría del calcio corporal (99%) y gran parte del fósforo (90%) se utiliza para la rigidez del esqueleto, bajo la forma de fosfato cálcico.

En el niño, el calcio y el fósforo son retenidos para el crecimiento del esqueleto. En el adulto se retiene bastante cantidad para compensar la pérdidas obligadas generalmente por orina y heces. En el embarazo y lactancia hay pérdidas fosfocálcicas suplementarias por el paso de estos elementos al feto o a la leche respectivamente. La eliminación renal está controlada por la reabsorción tubular, y la intestinal, en menor grado, por la secreción endógena. Por consiguiente tanto el niño como el adulto necesitan adaptar la absorción y el balance de calcio y fósforo a las necesidades del esqueleto frente a las variaciones de la dieta y eliminación. (7)

Además de estos requerimientos está la necesidad de mantener una concentración constante de calcio iónico, que interviene en la excitabilidad neuromuscular, la coagulación sanguínea y el ritmo cardíaco. El calcio además, permite

mantener la permeabilidad de las membranas celulares e interviene en la producción de numerosas hormonas y enzimas .Es decir que si bien el atributo principal del calcio consiste en fortalecer los huesos y los dientes, es un mineral muy versátil que puede jugar otros papeles importantes, como por ejemplo disminuir la presión arterial o prevenir el cáncer de colon. (8)

Respecto del fósforo, es ubicuo en su distribución corporal y es crítico para todos los procesos celulares. Los iones fosfatos están involucrados en todos los procesos metabólicos. Muchos alimentos lo contienen en cantidades importantes, por lo tanto no existe déficit de aporte de fósforo, que será más importante que el aporte de calcio. (8)

La fuente fundamental de calcio y fósforo del organismo es la dieta. La ingesta y la digestión controlan la cantidad disponible para la absorción.

**Tabla 1-II: Requerimientos diarios de Minerales**

<b>Categoría</b>	<b>Edad.(años)</b>	<b>Peso</b>	<b>Altura</b>	<b>Calcio</b>	<b>Fósforo</b>
	o condición	(kg)	(cm)	(mg )	(mg)
<b>Lactantes</b>	0,0 - 0,5	6	60	400	300
	0,5 - 1,0	9	71	600	500
<b>Niños</b>	1 - 3	13	90	800	800
	4 - 6	20	112	800	800
	7 - 10	28	132	800	800
<b>Varones</b>	11 - 14	45	157	1200	1200

	15 - 18	66	176	1200	1200
	19 - 24	72	177	1200	1200
	25 - 50	79	176	800	800
	51 +	77	173	800	800
<b>Mujeres</b>	11 - 14	46	157	1200	1200
	15 - 18	55	163	1200	1200
	19 - 24	58	164	1200	1200
	25 - 50	63	163	800	800
	51 +	65	160	800	800
<b>Embarazo</b>	1er trimestre			1200	1200
<b>Lactantes</b>	1er semestre			1200	1200
	2o semestre			1200	1200

Fuente :FAO/ OMS 2002

#### 1.4- Relación calcio fósforo en los alimentos

Cuando no se ingiere suficiente calcio, el cuerpo comienza a abastecerse del calcio que encuentra en los huesos y los va debilitando. Esto puede derivar en complicaciones como la osteoporosis, que afecta a mujeres y hombres mayores, dejando a los huesos vulnerables a varios tipos de fracturas.

La absorción intestinal del calcio tiene lugar en la parte alta del intestino delgado y necesita un pH ácido. Su coeficiente de absorción varía entre 25 y 50 %: aumenta cuando la cantidad ingerida es escasa y disminuye cuando ésta aumenta. Está íntimamente ligada a la presencia de fósforo: la relación Ca/P debe oscilar entre 0,5 y 2, siendo la ideal una relación mayor a 1. En efecto, un exceso de fosfatos precipita el calcio, lo cual hace que no pueda absorberse. El ácido fítico (presente en la envoltura de los cereales y de leguminosas) y el ácido oxálico (presente en espinaca) también producen sales insolubles.

La absorción intestinal de calcio se ve favorecida por la presencia de vitamina D y lactosa, de ahí el interés que tienen la leche y los productos lácteos para cubrir la

necesidad cálcica. La leche y el queso tienen una relación Ca/P ideal comprendida entre 1 y 1,4. (7) (8)

**Tabla 1-III: Contenido de calcio y fósforo en alimentos (mg/100 g)**

<b>Alimento</b>	<b>(mg/100g)</b>		<b>Relación</b>
	<b>Calcio</b>	<b>Fósforo</b>	<b>Ca/P*</b>
<b>Pescado (con espinas)</b>	732	197	3,72
<b>Leche (2 % grasa)</b>	120	85	1,41
<b>Queso blanco</b>	717	468	1,53
<b>Queso amarillo</b>	700	54	1,18
<b>Yogurt</b>	120	100	1,20
<b>Queso crema</b>	80	104	0,77
<b>Mantequilla</b>	24	23	1,04
<b>Leche de soya</b>	18	35	0,51
<b>Remolacha</b>	114	41	2,78
<b>Nabo</b>	137	29	4,72
<b>Verdolaga</b>	78	37	2,11

**Fuente:** Handbook No. 8. Composition of Foods. Vegetable and Vegetable Products. Nutrition Monitoring Division. DB Haytowitz and RH Matthews, USA, 1984. NUTRISIS, Instituto de Nutrición, Habana, Cuba.

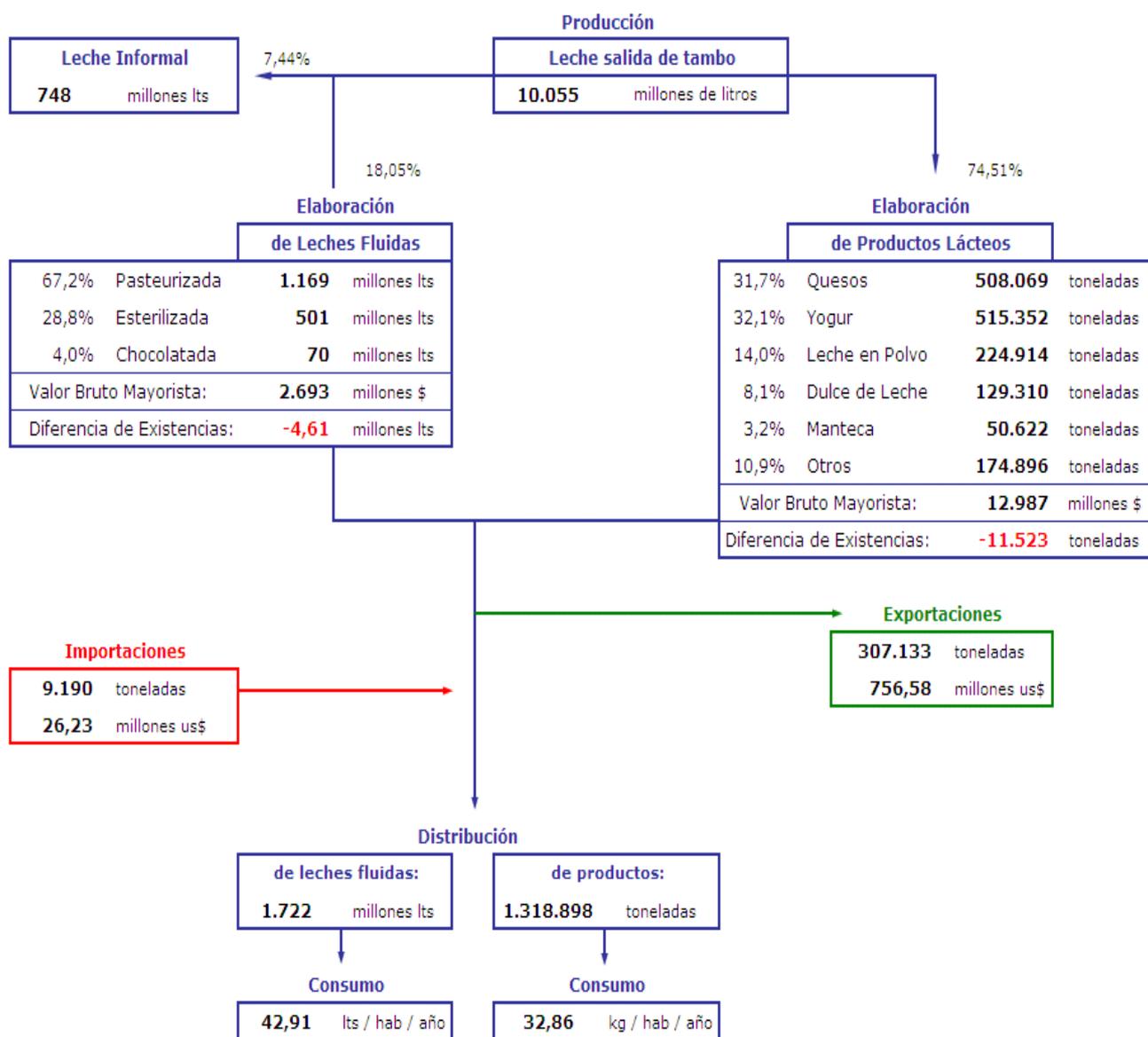
## **1.5- Datos estadísticos sobre producción y consumo de lácteos en Argentina**

### **1.5.1- Producción láctea argentina**

A continuación se presentan los principales ítems de las estadísticas lácteas para el año 2011 en la tabla 1-IV.

El total de leche en litros representa la cantidad de litros producidos en el año, De ese total un porcentaje corresponde a los litros destinados a Productos (denominando así a la leche utilizada para la elaboración de productos sólidos, concentrados, deshidratados, como ser quesos, manteca, leche en polvo, etc.), a Leches Fluidas (leche destinada a la elaboración de leches pasteurizada, esterilizada) y por último la estimación de la leche que no pasa por el circuito industrial formal (siendo aproximadamente el 7% de la leche total) a este rubro lo denominamos Leche Informal.

Tabla 1 IV Distribución estadística de producción láctea en argentina.



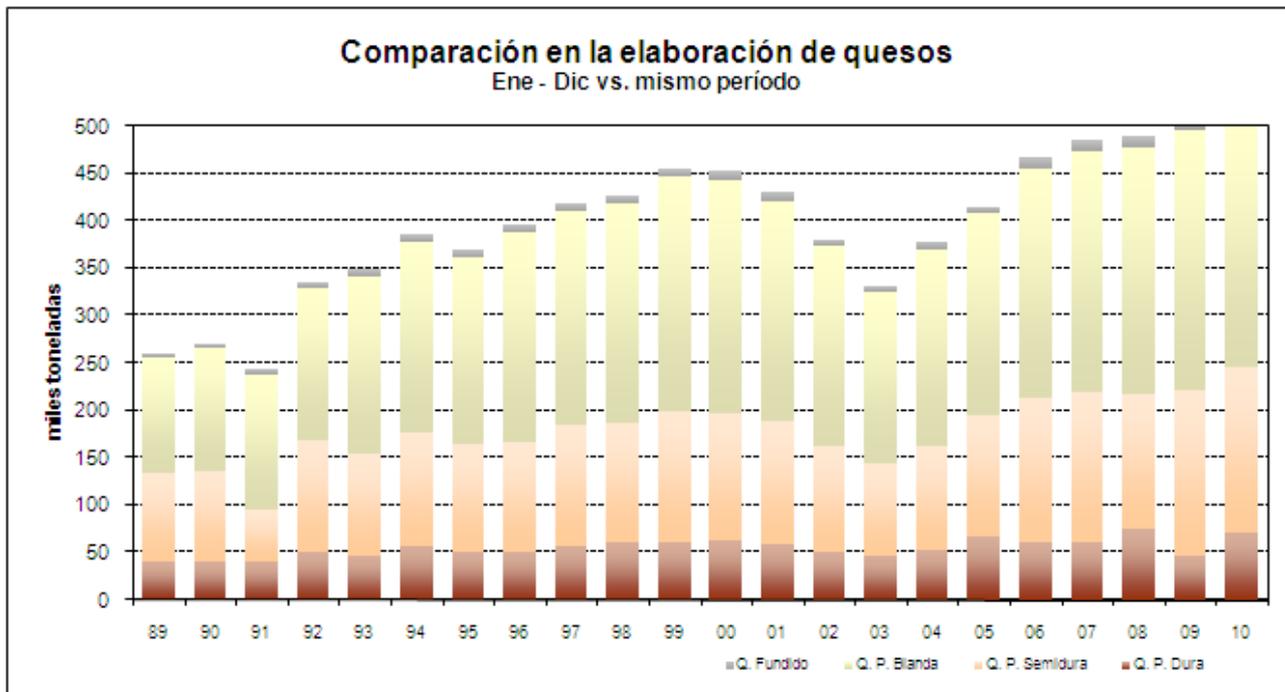
Fuente: Convenio Lechería - S.A.G.P. y A.- C.I.L. - F.I.E.L.

Como se ve el consumo de leche fluida es de 42, 9 l por habitante por año y el consumo de productos (sólidos, concentrados, deshidratados) es de 32,8 Kg por habitante por año.

En nuestro país en el año 2011, la producción de queso representó el 31% de la producción láctea, siendo el 50% de esos quesos de pasta blanda, gráfica 1-I, de allí la importancia de su estudio. (9)

### 1.5.2- Producción nacional de quesos.

**Gráfica 1-I Producción Nacional de queso. Comparación entre iguales períodos de distintos años.**



Fuente: Convenio Lechería - S.A.G.P. y A.- C.I.L. - F.I.E.L.

De acuerdo a los últimos datos disponibles, provenientes de la FAO, en 2005 Argentina fue el 12º país productor mundial de quesos (con una participación cercana al 2%). Los tres principales productores son Estados Unidos, Alemania y Francia, que en conjunto representan aproximadamente el 45% del total.

En el transcurso de la década 1998-2010 la producción nacional de quesos describió una curva tipo “V” con un pico mínimo en 2003, consecuencia lógica de la crisis económica general y la abrupta caída del consumo interno.

Entre 2003 y 2007 la elaboración se incrementó casi un 50%, manteniendo un aumento sostenido hasta 2011, siendo la principal fuente impulsora de este crecimiento, el consumo interno y en parte la expansión de las exportaciones.

A nivel de detalle por pasta, en este se gráfico también se observa que los quesos blandos son los más elaborados, en relación a las demás pastas.(9)

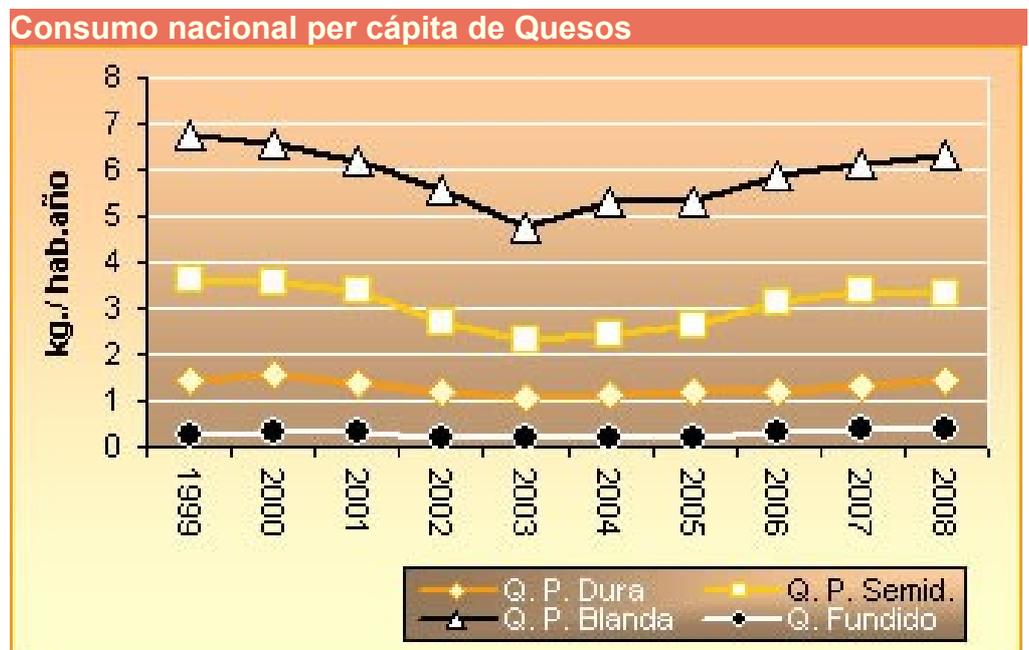
### **1.5.3- Consumo nacional de quesos**

Como consecuencia de la intensa corriente inmigratoria española e italiana, consumir queso es un hábito profundamente arraigado entre los argentinos, lo que explica el elevado nivel de consumo en relación con los ingresos de la población. Como se ve en la gráfica 1-II, el queso más consumido son los quesos de pasta blanda, donde el queso cremoso es el más representativo.

Durante la primera mitad de la última década el consumo per cápita de queso mermó desde 12 kg en 1999 a 8,3 Kg en 2003. Desde entonces, la recuperación de los ingresos produjo un aumento que hasta 2007 fue del 34%, lo que llevó al consumo per cápita a unos 11,1 Kg/año

Si bien la principal fuerza impulsora del crecimiento de la elaboración en la década fue el consumo doméstico (aumentó un 44% en dicho lapso y absorbió un 87% de la producción incremental), la expansión de las exportaciones también fue destacable, ya que se incrementaron más de un 100% entre 2003 y 2007, aunque en 2008 mermaron.

### 1-II Consumo Nacional de quesos



Fuente: Dirección Nacional de agroindustria en base a datos del convenio SAGPyA-CIL-FIEL

### **1.6- El queso y sus ventajas:**

El queso en comparación con la leche, se caracteriza por:

- Ser menos perecedero porque, según la tecnología empleada, pueden tener una vida útil que oscila desde los 5 o 6 días hasta los 5 o 10 años

- Un contenido de glúcidos muy bajo o nulo, dado que la lactosa retenida en la cuajada es transformada por los fermentos en ácido láctico.

- Un contenido de materia grasa generalmente más elevado y característico en cada tipo de queso.

- Una hidrólisis parcial de las proteínas en la maduración, lo que las hacen más fácilmente digeribles. Cabe señalar que su valor biológico es menor porque, salvo los quesos elaborados por ultrafiltración, faltan las proteínas del suero.

- Un contenido de calcio que varía considerablemente con la tecnología. Según la bibliografía, los quesos de coagulación predominantemente enzimática con desuerado rápido en tina por cocción, como por ejemplo el queso Gruyere, son los más ricos en calcio (1,00 g de Ca / 100 g de queso). Mientras que, quesos de coagulación predominantemente ácida y de desuerado lento como el queso Camember, son mucho mas pobres en calcio (0,15 g de Ca / 100 g de queso).

La leche que se produce en nuestro país, tiene diferencias más o menos significativas en la composición y en la carga microbiana cuando se la compara con la empleada en los quesos de otros países, conocidos a través de la bibliografía. Las diferencias en la materia prima y en la tecnología hacen que la información obtenida de la bibliografía internacional sobre el aporte de calcio y fósforo que el queso aporta a la dieta no se pueda extrapolar a nuestros quesos. Además, el Código Alimentario Argentino exige la pasteurización de la leche empleada en la elaboración de quesos con menos de dos meses de maduración, y permite el agregado de cloruro de calcio previo a la coagulación, lo que en la industria es una práctica habitual. No se han encontrado trabajos de investigación que aporten información sobre el contenido de minerales (fósforo y calcio) presente en los quesos argentinos. Tampoco se han encontrado estudios sobre la eventual dependencia entre la composición en minerales de los quesos y las fluctuaciones de la materia prima (composición, pH, acidez, concentración de proteínas, etc.) y de la tecnología (temperatura de pasteurización, desarrollo de acidez en la elaboración, cantidad de fermento, aditivos, pH final, etc.)

Si consideramos que el 49,4% de los quesos elaborados en nuestro país son de pasta blanda, podemos afirmar que son los más consumidos en la Argentina (Queso Cremoso, Queso Cuartirolo, Queso Por Salut y con un mercado pequeño pero con un gran crecimiento el Queso Mozzarella). Por lo tanto el estudio del contenido de minerales (Ca, P) en quesos cremoso es un tema de Interés para la comunidad.

### **1.7- Quesos argentinos de pasta blanda**

De los quesos que el Código Alimentario Argentino (C.A.A.) agrupa bajo esta denominación, el más conocido y consumido es el Queso Cremoso que esta definido en dicho código por el artículo 622 de la siguiente manera:

“Con la denominación de Queso Cremoso se entiende el producto fresco, elaborado con leche entera o normalizada, con o sin el agregado de crema, acidificada por cultivo de bacterias lácticas y coagulada por cuajo y/o enzimas específicas.

Deberá cumplimentar las siguientes condiciones:

- a) Masa: cruda, moldeada, refrigerada, salada y madurada en frío.
- b) Pasta: blanda, cerrada, algo elástica y grasosa; sabor dulce característico, ligeramente ácido, aroma suave y agradable; color blanco amarillento uniforme
- c) Contenido de grasa en extracto seco, Min.:50,0%
- d) Corteza: entera, lisa o ligeramente rugosa, de consistencia adecuada
- e) Forma : cilíndrica achatada o paralelepípedo
- f) Tiempo de maduración y peso:

Min.: 20 días, para los que pesen menos de 2,5 kg.

Min. : 30 días para los que pesen 2,5 a 5,0 kg.

Este producto se rotulará: queso Cremoso Argentino”

En el anexo Mercosur del mismo código, en la resolución del Ministerio de Salud y Acción Social N° 3 del 11 de enero de 1995 Grupo Mercado Común N° 69/93, que incluye los quesos de pasta blanda Argentinos Cuartirolo, Cremoso y Criollo, se especifican los requisitos microbiológicos que deben cumplir, los que se muestran en la tabla 1-V

**Tabla 1-V: Requisitos microbiológicos de quesos**

<b>Microorganismos</b>	<b>Criterios de Aceptación</b>	<b>Categoría ICMSF</b>	<b>Métodos de Ensayo</b>
Coliformes/g (30°C)	n = 5 c = 2 m = 5000 M = 10000	5	FIL 73A : 1985
Coliformes/g (45°C)	n = 5 c = 2 m = 1000 M = 5000	5	APHA 1992, Cap. 24 (1)
Estafilococos coag. positiva /g.	n = 5 c = 2 m=100 M=1000	5	FIL 145 : 1990
Salmonella spp/ 25 g.	n = 5 c = 0 m = 0	10	FIL 93A : 1985
Listeriamonocytogenes/ 25g	n = 5 c = 0 m = 0	10	FIL 143 : 1990

- a. n: número de unidades de muestra analizada.
- b. c: número máximo de unidades de muestra cuyos resultados pueden estar comprendidos entre m (calidad aceptable) y M (calidad aceptable provisionalmente).
- c. m: nivel máximo del microorganismo en el alimento, para una calidad aceptable.
- d. M: nivel máximo del microorganismo en el alimento, para una calidad aceptable provisionalmente.
- e. Fuente: ICMSF - Métodos de muestreo para análisis microbiológicos.
- f. Método de toma de muestra: FIL 50 B: 1985.

## **1.8- Características generales y tecnología de elaboración del Queso Cremoso Argentino.**

### **1.8.1- Elaboración de quesos. Características generales.**

La elaboración de quesos implica tres etapas fundamentales:

- Formación del gel de caseína.
- Deshidratación parcial del gel por sinéresis.
- Maduración enzimática del gel deshidratado.

Formación del gel de caseína: esta etapa se la conoce como coagulación o cuajada de la leche, físicamente el fenómeno consiste en la floculación de las micelas de caseína. Esta floculación se puede lograr por acidificación (quesos o cuajadas ácidas, quesos en pote) o por la acción de una enzima coagulante (la mayoría de los quesos con forma que se conocen en el mundo).

Cuando la coagulación es enzimática, generalmente se usa una enzima extraída del estómago de los animales mamones (Renina) también se pueden utilizar enzimas proteolíticas microbianas o vegetales.

Deshidratación parcial del gel : En esta etapa el gel se corta en cubos para incrementar la superficie de desuerado y se lo somete a una suave agitación para evitar el pegado de los granos de cuajada y la consecuente reducción de la superficie de desuerado.

En esta etapa, por pérdida de suero, se regula la actividad acuosa, el desarrollo de microorganismos y el pH, que hacen a un tipo determinado de queso.

Finalizada la etapa quedan dos fases:

- Una líquida (suero) dónde se encuentran las proteínas solubles, la lactosa y sales minerales. La caseína y la materia grasa que están presentes se las considera pérdidas. Esta fase tiene entre 7 y 7,5% de sólidos.

- Una fase sólida (cuajada) compuesta por el 95-98% de la caseína, el 90% de la materia grasa, un 4% de la lactosa y un 35-50% de la cenizas (Calcio fósforo fundamentalmente) que inicialmente formaban la leche.

Maduración enzimática del gel deshidratado: En esta etapa que se lleva a cabo en la cámara de maduración, se producen todas las reacciones químicas, la mayoría catalizadas por enzimas del fermento, del coagulante y las naturales de la leche, que llevan a desarrollar la textura, el sabor y aroma propio de cada tipo de queso.

## **1.8.2- Queso cremoso. Tecnología de elaboración**

### **1.8.2.1- Área de producción de queso cremoso en argentina**

El área de producción de queso cremoso en la Argentina se encuentra en la región del noroeste, en las provincias de Tucumán (norte), Jujuy, Salta, Catamarca (norte) y la región Pampeana en las provincias de Santa Fe (sur), Córdoba (sureste), La Pampa, Buenos Aires y San Luis (sur), según se muestra en las figuras 1-III y 1-IV.

**Figura 1-III regiones de de producción de queso cremoso**

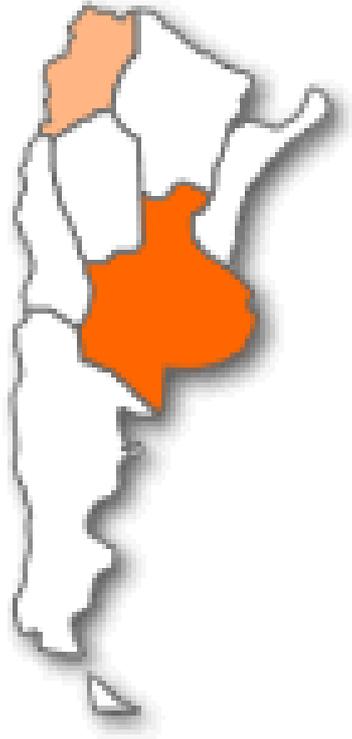
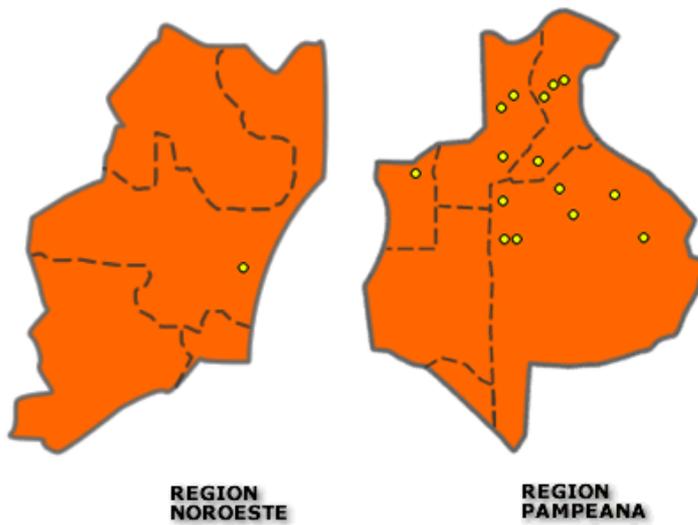


Figura 1-IV detalle de las regiones de producción de queso cremoso en argentina



Fuente: INTI-Lácteos

1.8.2.2- Tecnología.

El queso cremoso puede derivar de quesos Italianos con características similares como Crescenza, o Taleggio.

Es hoy el queso de mayor consumo en el país y como ya vimos representa casi el 40% de la producción nacional de quesos. Se lo consume como producto de mesa, pero tiene muchas aplicaciones culinarias (INTI).

Como lo define el Código Alimentario Argentino, es un producto fresco, de alto contenido graso, muy cremoso, de corto período de maduración y de sabor suave, algo dulce y ácido. La pasta es blanco-amarillenta y lisa.

Su formato más común es un paralelepípedo cuadrado de unos 24 cm de lado por 8 cm de altura.

En su elaboración se utiliza leche entera o también con agregado de crema, según el contenido graso que se desea en el producto final. La leche es siempre pasteurizada, generalmente en sistema a placa (pasteurización alta) a 72° C por 15 segundos, aunque aún hoy existen algunos establecimientos que pasteurizan en tina a 63° C durante 30 minutos.

Luego de la pasteurización la leche se enfría a 38°C y se procede a agregar  $\text{CaCl}_2$  a razón de 200-400 g/1000 litros, para corregir las variaciones de los contenidos en calcio de la leche o el equilibrio del calcio entre las fases soluble y coloidal debido a los efectos de la refrigeración o del tratamiento térmico, de este modo se mejora las propiedades de coagulación de la leche. (5)

En cuanto al fermento láctico utilizado, puede ser un fermento natural de leche obtenido en la misma industria o un fermento comercial. En la actualidad se ha difundido el uso de los fermentos comerciales de uso directo a base de *Streptococcus thermophilus*. El fermento directo se agrega a la leche a 37° C como polvo o sólido

congelado, o se disuelve previamente en un volumen de leche pasteurizada y enfriada. En el caso de los productos semidirectos, en primer lugar se hace un precultivo que luego es agregado a la leche. El precultivo se prepara en cada elaboración.

El coagulante más comúnmente utilizado es el proveniente de bovino adulto, aunque también se utilizan proteasas ácidas de origen microbiano. Se agrega una cantidad de coagulante relativamente alta, 40 ml de la preparación 1/10.000 unidades Soxhlet por cada 100 litros de leche. El coagulante se agrega a la leche ya inoculada con el fermento (2g/100 l de leche para el caso de fermento directo), a una temperatura de 38° C. Luego de la coagulación que implican unos 20 minutos, se procede al corte de la cuajada en granos grandes de aproximadamente 2 cm de lado.

La mezcla de la cuajada y suero se agita y se deja reposar alternativamente, en forma lenta y con cuidado, hasta lograr el porcentaje de humedad conveniente.

La cuajada y el suero son descargados en moldes de acero inoxidable de 24 x 24 cm de lado y de aproximadamente 15 cm de altura. Los moldes con la cuajada se apilan de dos o tres para lograr un breve prensado de la masa, luego son ubicados en un calorífero aproximadamente 45° C. De esta forma se permite el desarrollo de las bacterias constitutivas del fermento, que comienzan su proceso de acidificación de la pasta.

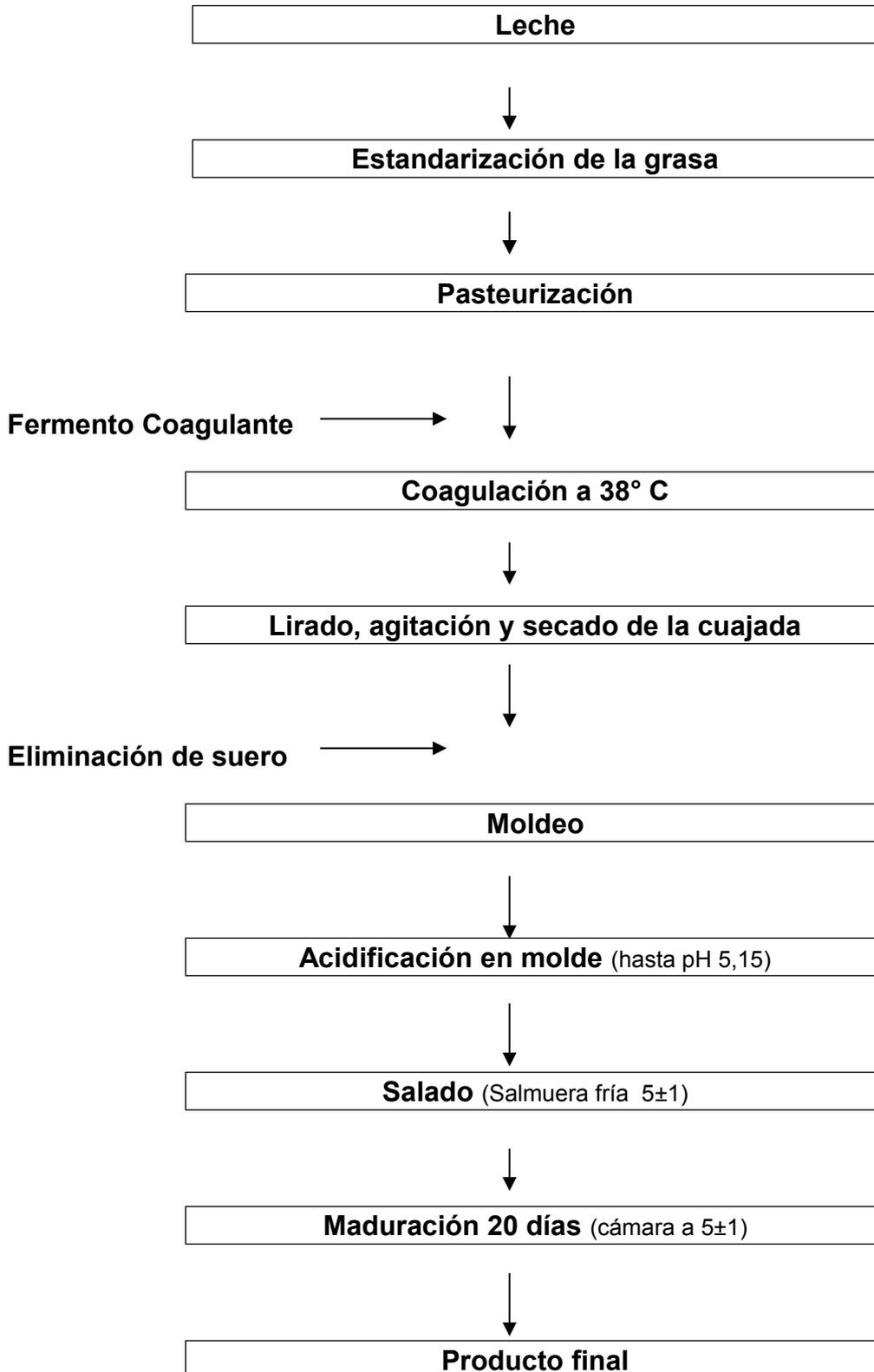
Los valores de pH y acidez Dornic se controlan en la cuajada y en el suero que exuda la cuajada. Una vez que el pH de la masa a alcanzado  $5,2 \pm 1$  (65° Dornic en el suero exudado), los quesos son sumergidos en salmuera a  $5^{\circ} \pm 1$  C a de detener inmediatamente el proceso de acidificación.

La permanencia en salmuera se prolonga a razón de una hora por kilo de peso. Cumplido este tiempo, se sacan de la salmuera y se colocan en cámara 5° C, para llevar a cabo su proceso de maduración que dura entre 20 y 30 días según el tamaño.

El envasado al vacío en bolsas plásticas termocontraíbles se lleva a cabo a los tres o cuatro días de maduración. Si se opta por envoltura de papel, el queso se recubre previamente con una capa de fécula de maíz. (10) (11)

En la fig 1-V se puede observar un esquema de la elaboración de queso cremoso Argentino.

**Figura 1-V: Esquema de elaboración de queso cremoso en Argentina**



### 1.8.3- Composición porcentual de queso cremoso

Su composición expresada cada 100g de muestra se ve en la tabla 1-VI  
Estos datos fueron obtenidos de las páginas de INTI – Lácteo, pero no se encontró, en ella datos de la composición mineral de los mismos.

**Tabla 1-VI composición cada 100 g de queso cremoso**

Proteínas (g)	19,7
Grasas (g)	22,9
Hidratos de carbono(g)	4,2
Cenizas (g)	3,30
Energía (Kcal)	302

Fuente: Argenfoods

Como se puede ver en la tabla los minerales se engloban en el término cenizas, sin hacer un detalle de los componentes, entre ellos el calcio y el fósforo.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo General:**

Ampliar la información referente a la composición mineral de los quesos blando argentino en cuanto al contenido de calcio y fósforo para:

- Hacer un aporte a las empresas productoras de queso y que estas dispongan de criterios acerca de la influencia de la materia prima y de los parámetros tecnológicos en la retención de estos minerales en el queso cremoso.
- Aportar información a la población y fundamentalmente a los profesionales de la salud dedicados a nutrición y alimentación saludable y equilibrada, a fin de que cuenten con los valores de calcio y fósforo que puede aportar el queso cremoso, que en distintas formas, es el más ampliamente consumido en la Argentina.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- Adoptar una metodología de análisis que resulte práctica para su uso en la industria a fin de obtener información sobre el contenido de fósforo y calcio en quesos que se comercializan en nuestro país, principalmente en quesos blandos tipo cremoso que es el producto con más producción y consumo en Argentina.

- Estudiar, en elaboraciones a escala laboratorio de queso cremoso como inciden distintos parámetros tecnológicos, en el contenido de calcio y fósforo en los quesos al final de la maduración. Los parámetros evaluados fueron:
  - a) La acidez desarrollada en la leche, de manera de evaluar como incide en la concentración de los minerales estudiados en el queso, leches con acidez en el límite de lo aceptado por las normas vigentes.
  - b) La cantidad de  $\text{CaCl}_2$  adicionada a la leche de elaboración, agregada en todas las industrias y muy empíricamente en la industria pequeña y mediana.
  - c) La cantidad de fermento, problema que surge con el empleo de los fermentos de adición directa en tina, donde se agregan solamente microorganismos.
  - d) El tratamiento térmico de la leche previa a la elaboración. El mismo en la mayoría de los casos es una pasteurización, en el queso cremoso suele ser más intenso a fin de incrementar el rendimiento.

Los resultados obtenidos constituirán un aporte para caracterizar los quesos blandos argentinos. Además se podrá lograr, a partir del análisis de los resultados y de las condiciones en las que fueron obtenidos, un conocimiento con base científica acerca de cuales son los parámetros tecnológicos que influyen sobre el contenido de minerales y en que medida se deben variar con el objeto de obtener productos con una mejor característica nutricional.

### **3- Materiales y métodos**

#### **3.1-Determinaciones realizadas en quesos comerciales.**

En la presente tesis se desarrollaron tres etapas consecutivas que en algunos puntos fueron simultáneas.

En la primera etapa, la mayor actividad se centró en la búsqueda bibliográfica de técnicas potencialmente utilizables para determinar calcio y fósforo en queso. La determinación de calcio fue la que tuvo más variantes, por lo general en función de la matriz alimentaria y con muy poca referencia para su aplicación en queso. Esto generó la necesidad de aplicar los métodos encontrados en la bibliografía a dos muestras comerciales de queso cremoso para evaluar la que más se adaptase a los fines de la tesis.

Evalrados los resultados, en una segunda etapa se analizaron quesos comerciales de empresas representativas de la región, en dos fechas distintas. En esta etapa se buscó ajustar la selección de las técnicas analíticas y disponer de valores de calcio y fósforo de quesos del mercado, así como también del rango de variación para cada empresa y entre ellas.

Esta información preliminar, no disponible en la bibliografía para queso cremoso, permitió evaluar si los quesos considerados testigos realizados en planta piloto se elaboraron con una tecnología semejante a la usada en la industria, al menos en cuanto a la retención de calcio y fósforo en el queso, de manera de poder extraer conclusiones válidas de los quesos experimentales.

Cabe aclarar que a las muestras comerciales también se les determinó pH y humedad, de manera de comparar con los valores del CAA.

### **3.1.1- Muestreo y conservación de las muestras.**

El muestreo se realizó según la norma FIL-IDF 50A: 1980. (12)

Para los ensayos fisicoquímicos se cortó una sección circular de los quesos de aproximadamente 100 g de peso. Se eliminó la parte más externa, se homogeneizó rápidamente a fin de no perder humedad y se pesó: 1 g aproximadamente (pesada exacta) para realizar la determinación de calcio y fósforo, previo tratamiento de la misma, 4 g (pesada exacta) para la determinación de humedad y aproximadamente 10 g de muestra se destinaron a la determinación de pH.

El resto de la muestra se almacenó congelada a  $-18^{\circ}$  C hasta concluir la etapa de análisis.

### **3.1.2-Tratamiento de la muestra para la determinación de calcio y fósforo.**

El tratamiento de la muestra fue realizado según la AOAC Official Method Analisis 994.25 (1995) (13). Una vez pesada la cantidad necesaria, se colocó en un crisol de porcelana, se introdujo en mufla a  $100^{\circ}$  C durante una hora y luego se fue subiendo gradualmente la temperatura hasta llegar a los  $525^{\circ}$  C, temperatura a la que permaneció hasta obtenerse cenizas blancas. Una vez obtenidas las cenizas, se enfrió a temperatura ambiente y se agregaron unas gotas de ácido nítrico al 50%, para eliminar partículas negras, para lo cual se colocó nuevamente en mufla. Luego se enfrió en desecador y se disolvió con gotas de ácido clorhídrico concentrado, enrasándose en matraz aforado de 100 ml con agua destilada.

### 3.1.3-Preselección de método para la determinación de calcio

Con el fin de seleccionar la técnica de determinación de calcio más adecuada, teniendo en cuenta el tipo y número de muestras y poner a punto el tratamiento de la misma, se trabajó con dos muestras de quesos. Las mismas se sometieron al tratamiento indicado en el punto anterior 3.1.2., y sobre alícuotas de la solución se probaron las siguientes técnicas:

-Determinación volumétrica: esta técnica utiliza EDTA como reactivo titulante y calcón como indicador. Para realizar esta determinación se tomó una alícuota de solución de muestra adecuada, se reguló el pH a 12, a fin de precipitar magnesio como  $Mg(OH)_2$ , y de esta manera evitar que reaccione con EDTA. Luego se tituló con el reactivo titulante hasta el viraje del calcón de rojo vinoso al azul.

-Determinación volumétrica, utilizando EDTA como reactivo titulante y visualización potenciométrica de punto final con electrodo de calcio. Esta técnica es similar a la anterior, solo que el punto final de la titulación, se visualizó con el salto de potencial que se produce al final de la reacción entre EDTA y calcio.

- Determinación volumétrica con permanganato como reactivo titulante AOAC944.03 (14), (15). En esta técnica el Calcio se precipitó a pH 4 como oxalato (si hay fosfato presente se puede eliminar con ácido acético), posteriormente el oxalato de calcio formado se separó de la solución y se disolvió con ácido sulfúrico liberando así ácido oxálico el cual se tituló con una solución valorada de permanganato de potasio.

-Determinación directa de calcio con electrodo selectivo de Calcio: La determinación de calcio se llevó a cabo por potenciometría directa utilizando un electrodo selectivo de calcio Orion Modelo 93-20, un electrodo de referencia Orion de Junta simple Modelo 90-01 y un potenciómetro Orion 420 A. (16)

-Determinación por Absorción Atómica: AOAC Official Method 99125 (17): se llevó a cabo utilizando un espectrómetro de absorción y emisión atómica de llama Perkin Elmer modelo 3110.

Se realizó una curva de calibrado con soluciones estándar de 0 ppm a 7 ppm a partir de una solución madre de 1000 ppm de calcio. Para analizar las muestras se realizaron las diluciones necesarias a partir de la solución preparada en 3.1.2. utilizando como diluyente una solución de  $\text{LaCl}_3$  para eliminar interferencias.

### **3.1.4-Selección del método más conveniente para la determinación de calcio**

De la preselección descrita en el punto anterior surgieron dos métodos como los más indicados (Potenciometría directa con electrodo selectivo de calcio y Espectrofotometría de Absorción Atómica). Para la elección definitiva, se trabajó con los dos métodos preseleccionados en muestras de quesos cremosos pertenecientes a cinco empresas lácteas del país. Finalizadas las experiencias se adoptó como método la determinación directa de calcio con electrodo selectivo.

### **3.1.5- Determinación de calcio con electrodo selectivo.**

#### **3.1.5.1-Descripción del electrodo de estado líquido**

Un pequeño disco de material filtrante hidrofóbico hace de barrera entre las soluciones interna y externa. El disco está en contacto con un disolvente orgánico que es inmiscible con el agua y en el disolvente se diluye una sal del ión deseado con otro

ión de peso molecular relativamente alto y de solubilidad mucho mayor en la fase orgánica que en la acuosa. Un esquema del electrodo se ve en la figura 3-1

El disolvente pasa por capilaridad a través de los poros del disco y se produce un contacto eléctrico entre ambas soluciones acuosas. Se establece entonces un equilibrio entre el ión común en la membrana y en las soluciones. El potencial resultante del electrodo interno y la solución del electrodo de vidrio, cumplen la ecuación de Nernst..

Un electrodo selectivo para calcio, por ejemplo, se puede preparar con una solución de tris 2-dietilhexil fosfato de calcio. Las moléculas neutras, no disociadas, están libres de difundir en los poros de la membrana saturada con el solvente y las moléculas en la superficie de la membrana son capaces de intercambiar iones calcio con la solución de la muestra.

Cuando la membrana está en contacto con una solución de  $\text{Ca}^{2+}$ , el potencial del electrodo crece a través de la membrana. Este potencial, que depende de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en solución, se mide contra un potencial de referencia constante.

El potencial medido presenta una relación logarítmica lineal con la actividad del ión  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución, según la ecuación de Nernst.(18)

Para que la ecuación de Nernst relacione el potencial medido con concentración en vez de actividad del ión analizado, hay que lograr que la fuerza iónica de la solución sea constante. Para ello se agrega una solución concentrada de un electrolito inerte (ISA), la cual se agrega en una concentración tal que la fuerza iónica así alcanzada haga despreciable la contribución de electrolitos originales y se puede expresar:

$$E = k + \frac{0,059}{2} * \text{Log} [ \text{Ca} ]$$

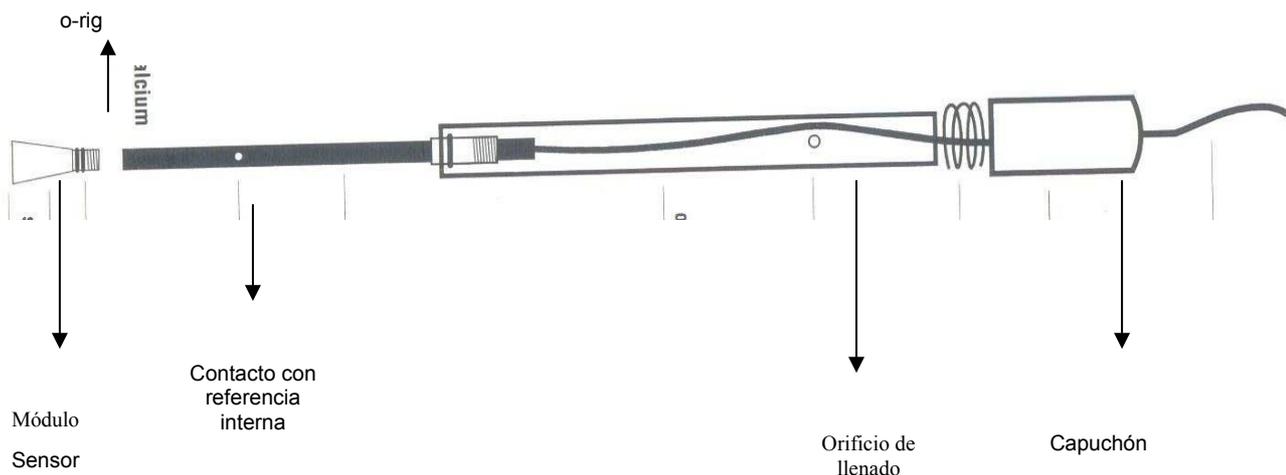
Donde

E es la diferencia de potencial medido

k es la ordenada al origen.

El electrodo de calcio mide concentraciones entre  $10^{-5}$  M y  $10^{-1}$  M. Su reproducibilidad está limitada a factores tales como fluctuaciones de temperatura, ruidos e impulsos. No depende de la concentración. La misma se estima en un 4%

**Fig. 3-I: Esquema del electrodo selectivo de calcio**



### 3.1.5.2-Efecto del pH en la determinación de Calcio con el electrodo

Efecto del pH.: a bajo pH los  $H^+$  interfieren en mediciones de baja concentración de calcio debido al remplazo de los iones  $Ca^{++}$  por  $H^+$  en el intercambiador, lo que hace que el electrodo se haga sensible al pH además del pCa. Concentraciones de  $OH^-$  elevadas producen la precipitación de  $Ca^{++}$  como  $Ca(OH)_2$ , produciendo error por defecto. El rango de pH del electrodo, en el que se debe trabajar es entre 5 y 11.

### 3.1.5.3-Curva de calibrado

Previo chequeo de la pendiente del electrodo para evaluar su correcto funcionamiento, se realizó una curva de calibrado, con soluciones estándar (50 ml) de 100, 50, 10, 5 y 1 ppm de  $\text{Ca}^{++}$  por dilución de una madre de 1000 ppm de  $\text{Ca}^{++}$ , (preparada con  $\text{CaCO}_3$ ). Para cada lectura se agregó 1 ml de ISA (solución reguladora de fuerza iónica de KCl 4M). Se sometió a agitación, se introdujeron los electrodos y una vez estabilizado la lectura, se leyó los mV correspondiente a cada patrón. Se graficaron potenciales versus log Concentración. Se ajustó por cuadrados mínimos y se obtuvo la ecuación de la recta. (19) (En el Anexo se presenta una curva de calibrado)

En el caso de las muestras se tomó un volumen conveniente en cada caso (de la solución preparada en 3.1.2), se llevó a pH 6,5, se enrasó a 50 ml y luego se realizó como en la curva de calibrado. Los valores de concentración de calcio se obtuvieron a partir de esa curva.

### 3.1.6- Determinación de fósforo por espectrofotometría U.V.-Visible

Se realizó colorimétricamente según el método de la AOAC 99125 Official Methods of Analysis (16), (20) Las soluciones estándar para la curva de calibrado ( 0,8; 2; 4; 6 y 8 ppm de fósforo) se prepararon a partir de una solución madre de 20 ppm de P utilizándose como patrón  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (previamente secado en estufa a  $105^\circ\text{C}$ ). A cada patrón se le agregó 10 ml de una solución de molibdovanadato, se enrasó a 50 ml con agua destilada y se leyó la absorbancia a 400 nm. Se realizó la curva de calibrado,

graficando absorbancia versus logaritmo de la concentración. Se ajustó por cuadrados mínimos y se obtuvo la ecuación de la recta. (En el Anexo se presenta una curva de calibrado)

Para analizar las muestras, se tomó un volumen conveniente en cada caso (de la solución preparada en 3.1.2) y luego se realizó como los patrones de la curva de calibrado. El equipo utilizado para tal fin fue un espectrofotómetro Metrolab 325.

### **3.1.7-Determinación de pH**

Para tal fin se utilizó un peachímetro marca ORION (Orion Research Incorporate, Estados Unidos) provisto de un electrodo combinado (vidrio-calomel) el cual se calibró con tampones a pH 4,0 y pH 7,0.

Para realizar ésta determinación en queso, la muestra homogenizada se colocó en forma compacta en un colector pequeño, de manera de garantizar un buen contacto del peachímetro con la pasta del queso(39).

### **3.1.8-Humedad.**

Se realizó la determinación de humedad según la norma FIL-IDF 4a:1982.(21)

Se pesó entre 1 y 3 g de muestra, se colocó en un cristizador de vidrio previamente tarado, con unos 25 g de arena tratada con HCl concentrado y provisto de varilla para agitación. Se mezcló bien la muestra con la arena y se colocó en estufa nuevamente a  $102^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$  hasta pesada constante. Se enfrió en desecador y se registró la pesada.

El contenido de humedad se calculó mediante la expresión:

$$\%H = \frac{(m_1 - m_2)}{m_1} * 100$$

Donde:

%H: porcentaje de humedad.

m<sub>1</sub>: peso de la muestra antes de entrar a estufa.

m<sub>2</sub>: peso de la muestra después de salir de estufa.

## **3.2-Quesos elaborados en planta piloto.**

### **3.2.1- Materia prima**

La leche cruda se retiró de la planchada de recibo de la planta de la firma Milkaut Cooperativa Limitada posee en Colonia Nueva (Provincia de Santa Fe).

Al arribo a la planta piloto del INLAIN fue volcada en una tina, donde se controló pH y acidez Dornic y se tomó muestra para la determinación de materia grasa, sólidos totales, proteína total y cantidad de caseína.

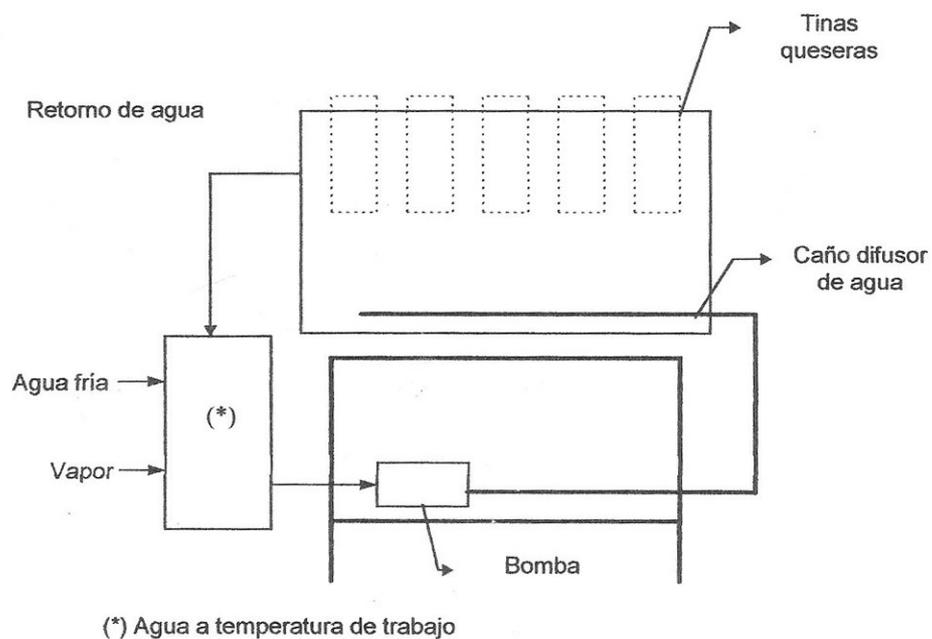
### **3.2.2- Equipo utilizado en las elaboraciones.**

Para el estudio de la composición mineral en cuanto al contenido de calcio y fósforo en quesos blandos se planificó un esquema de trabajo que consistió en la elaboración de cinco quesos por tanda, uno testigo y cuatro quesos experimentales.

Para realizar dichas elaboraciones en forma simultánea se contó con un equipo a escala laboratorio con todos sus accesorios (liras, palas y moldes) (ver figura 3-II). Las dimensiones del cuerpo principal del equipo, que se encuentra apoyado sobre una estructura de hierro son: 125 cm de alto por 32 cm de ancho y 45 cm de largo. Está construido de acero inoxidable y cuenta con cinco tinas cilíndricas con fondo cóncavo de 16 cm de diámetro y 32 cm de altura, con capacidad para procesar 5 litros de leche cada una. Las tinas se insertan en el cuerpo principal, por donde circula agua a la temperatura de trabajo. Esta temperatura se logra en un tanque pulmón calefaccionado por camisa y mediante una bomba centrífuga se establece la circulación que permite mantener la temperatura deseada constante en todas las tinas durante las operaciones de coagulación, lirado y secado de la cuajada.

(21)

**Fig 3-II Esquema del equipo de elaboración**



### **3.2.3.- Esquema de elaboración de quesos experimentales.**

Las distintas variables utilizadas en la elaboración, influyen en la concentración de calcio y fósforo en quesos maduros.

Es conocido que el agregado de  $\text{CaCl}_2$  en la leche de elaboración, modifica algunos parámetros tecnológicos como tiempo de coagulación y velocidad de desuerado(38). Esto se debe a que el descenso de pH favorece la fase primaria de coagulación (debido a que el coagulante incrementa su actividad enzimática) y fundamentalmente por la presencia de ión calcio que participa en la fase secundaria de la coagulación. Por otro lado se le atribuye al calcio, un incremento en la dureza del queso y la presencia de sabores amargos. En general, no se tiene demasiados datos de cómo influye la concentración de  $\text{CaCl}_2$  de la leche de elaboración, en la concentración de calcio del queso y en particular, del queso cremoso al final de la maduración. En países como Francia e Italia, el agregado de  $\text{CaCl}_2$  está prohibido. En nuestro país, el Código Alimentario Argentino admite el agregado de  $\text{CaCl}_2$  en la elaboración de queso. La concentración agregada es diferente para cada empresa e incluso puede variar para cada tipo de queso. En pequeñas y medianas empresas, donde el control no es tan riguroso, esa cantidad puede variar con cada quesero de turno. En base a esto y sabiendo que el queso cremoso es el más consumido en nuestro país, es interesante conocer como influye el agregado de  $\text{CaCl}_2$  en la concentración de calcio del producto final, ya que representa un buen aporte de este elemento en la dieta de nuestros hogares.

Otro parámetro a estudiar, es la influencia de la acidez inicial de la leche en la concentración de calcio y fósforo del queso maduro. Para este análisis se comparó el

queso obtenido de una leche normal con uno obtenido de una leche acidificada con  $\delta$  Lactona de ácido glucónico (asemejando una acidificación por bacterias lácticas)(22), (23), (24), (25). Las pequeñas y medianas industrias lácteas, están propensas a recibir en verano, leche con acidez desarrollada. Cuando la acidificación es descontrolada, la leche no se puede destinar a producción de quesos, pero cuando el descenso de pH es de 0,2-0,3 unidades suele ser utilizado para la producción de quesos cremosos, ya que es el queso que se vende más rápidamente y si la transformación es correcta, aporta poco defectos en el queso. De lo que no se tiene mucha información es sobre las concentraciones de calcio y fósforo en estos quesos al final de la maduración.

Para aumentar el rendimiento quesero, la práctica empleada, es someter a la leche de elaboración a un tratamiento térmico superior al de pasteurización. De este modo, se produce la desnaturalización de las proteínas y por lo tanto la precipitación de las mismas logrando que queden retenidas en el queso (25),(26),(27). Estas proteínas, retienen cinco veces más agua que la caseína. Como consecuencia de la retención de las proteínas del suero y la mayor retención de agua, el rendimiento expresado como Kg de queso/100 mL de leche, incrementa sensiblemente (28), (29).

Para lograr una buena coagulación en las leches tratadas térmicamente, se debe acidificar a un pH próximo a 6,2 y agregar  $\text{CaCl}_2$ . Si bien esta metodología fue estudiada (30), no se reportan datos del calcio y fósforo retenidos en el queso.

Con el fin de estudiar la influencia de los distintos parámetros en la concentración de calcio y fósforo del queso maduro, se realizaron simultáneamente cinco quesos experimentales, partiendo de la misma leche y siguiendo el protocolo de elaboración de un queso cremoso, según el esquema de la tabla 3-I

Este esquema de elaboración se repitió cuatro veces, es decir que se hicieron cuatro elaboraciones de cinco quesos experimentales cada una.

<b>Tipo de queso</b>	<b>Cloruro de calcio</b>	<b>Temperatura de Pasteurización</b>	<b>δ Lactona</b>	<b>fermento 1° y 2° Elab.</b>	<b>fermento 3° y 4° Elab.</b>
<i>QUESO TESTIGO</i>	2 g/tina	(65°C 20 min)	Sin agregado	10 ml/ tina	5 ml/ tina
<i>QUESO EXPER.1</i>	Sin agregado	(65°C 20 min)	Sin agregado	10 ml/ tina	5 ml/ tina
<i>QUESO EXPER.2</i>	4 g/tina	(65°C 20 min)	Sin agregado	10 ml/ tina	5 ml/ tina
<i>QUESO EXPER.3</i>	2 g/tina	(65°C 20 min)	5 g / tina antes de la pasteurización	10 ml/ tina	5 ml/ tina
<i>QUESO EXPER.4</i>	2 g/tina	(85°C 2 min)	5 g / tina	10 ml/ tina	5 ml/ tina

En la tabla no se incluye el coagulante debido a que en todas las elaboraciones se utilizó renina en polvo, enzima proteolítica producida por fermentación, marca Maxiren 150, fabricado por Gist-Brocades (Francia) y se empleó en la misma concentración. Para

facilitar su dosificación se disolvió en un buffer de pH 5,5, la concentración a agregar, surgió del análisis del parámetro  $r+k_{10}$ , determinado con un equipo Formagraph, según la metodología descrita por Alonso y otros (21) lo que permitió obtener en cada tina una consistencia de lirado en tiempos iguales.

Para todas las elaboraciones, se utilizó un fermento liofilizado de adición directa en tina, producido por el Centro Sperimentale del Latte (Italia) y fraccionado y distribuido en el país por Diagramma S.A. (31). El fermento está constituido por una mezcla de cepas de *Streptococcus Salivarius subsp thermophilus*, que se comercializa bajo el nombre de STA en sobres para 1000 l de leche. Previo a su uso, en el laboratorio, se disolvió el contenido de un sobre en 1l de leche estéril. Para estudiar la influencia de su concentración en la composición mineral del queso, una vez disuelto el fermento se agregó en cada tina 5 ml y 10 ml para trabajar con el doble de concentración (Tabla 3-I).

El  $\text{CaCl}_2$  fue agregado, en los casos que correspondió (tabla 3-I) como solución al 40% p/v.

La acidificación en las tinas IV y V se logró por la hidrólisis de la  $\delta$  Lactona del ácido glucónico, que se agregó en la cantidad necesaria para lograr el descenso de pH deseado (tabla 3-I).

A los quesos con quince días de maduración se les determinó: humedad, pH, fósforo y calcio.

Todas las elaboraciones se llevaron a cabo en la planta piloto del Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) y las determinaciones analíticas se realizaron en el laboratorio de Química Analítica del departamento de Química de la Facultad de Ingeniería Química De la U.N.L...

### 3.2.4- Elaboración de quesos experimentales

Se elaboraron en total 20 quesos en partidas de 5 por vez. Cada partida contaba con un queso testigo y cuatro experimentales (tabla 3-1).

Cada una de las tinas se llenó con 5 l de leche cruda. En las tinas desde la I a la IV se realizó una pasteurización de baja, calentando a 65°C durante 20 minutos. En la tina IV se agregó  $\delta$  Lactona para lograr un descenso de pH de 0,2 unidades. En la tina V, se realizó una pasteurización de alta, calentando hasta 85°C, temperatura que se mantuvo por 2 minutos, se enfrió a 38°C, se agregó  $\delta$  Lactona. Finalizados los tratamientos todas las tinas se encontraban a una temperatura de 38° C. Bajo agitación se adicionó  $\text{CaCl}_2$ , en las tinas que correspondía, hasta alcanzar en la leche de elaboración la concentración propuesta en cada experiencia. Luego se agregó el fermento y el coagulante. Completado el mezclado se suspendió la agitación y se dejó en reposo para que se forme y endurezca el coagulo (Foto 3-1).

**Foto 3-I. Equipo de acero inoxidable donde se elaboraron los quesos**



Transcurridos unos 20-25 minutos, se procedió al lirado, es decir al corte de la cuajada en granos grandes de aproximadamente 2 cm de lado y se dejó en reposo hasta que el suero liberado cubrió la cuajada.

La mezcla de la cuajada y suero se agitó y se dejó reposar alternativamente en forma lenta y con cuidado, hasta lograr en la cuajada el porcentaje de humedad deseado para un queso tipo Cremoso (Foto 3-II).

**Foto 3-II Etapa de agitación y secado de la cuajada.**



La cuajada y el suero de cada tina se descargaron en un molde redondo de acero inoxidable, se realizó un breve prensado de la masa, colocando un molde sobre otro. Los quesos fueron dados vuelta en su molde para favorecer el desuerado y mejorar su aspecto externo, luego se colocaron en un lugar cálido (40-42°C) (Foto 3-III) para completar el desuerado y favorecer el desarrollo de las bacterias del fermento y lograr acidificación de la pasta en tiempos semejantes.

**Foto 3-III Etapa de acidificación**



Una vez que el pH de la masa alcanzó un valor de  $5,2 \pm 0,1$ , los quesos fueron salados por inmersión en salmuera fría ( $5^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ ) a razón de una hora por kilo (Foto 3-IV). El enfriamiento rápido que sufre la cuajada en el salado detiene el proceso de acidificación.

**Foto 3-IV Salmuera de inmersión**



Cumplido el tiempo de salado de los quesos se sacaron de la salmuera y se colocaron en cámara de maduración ( $5^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ ). A los dos días, cada uno de ellos se

envasó bajo vacío en bolsas plásticas termocontraíbles y se continuó el proceso de maduración por 15 días.

En todos los casos se tomó el pH de la cuajada y del suero en el momento del moldeado y en el queso al ingreso de la salmuera y al final de la maduración.

### **3.2.5.-Determinaciones Analíticas.**

#### **3.2.5.1-Determinaciones realizadas sobre la leche y durante el proceso de elaboración.**

##### **3.2.5.1.1-pH y acidez Dornic.**

El pH se midió en la leche de arribo y coagulación, en el suero de la tina de elaboración y en el suero exudado por la cuajada durante el moldeo para controlar su acidificación. Para tal fin se utilizó un peachímetro marca ORION, indicado en 3.1.7

La medición de pH se realizó directamente en la muestra de leche, suero y en cuajada, por inmersión del electrodo del peachímetro en la misma.

La acidez Dornic se determina con una titulación ácido-base, utilizando una solución de NaOH N/9 como titulante y fenolftaleína como indicador (1% en alcohol etílico 96%). La acidez, en grados Dornic, expresa el contenido de ácido láctico y se define como los ml de NaOH N/9 necesarios para neutralizar 100 ml de leche.

La determinación se realizó tomando una muestra de 10 ml de leche, se agregaron gotas de fenolftaleína y se valoró con la solución básica.

Expresión de resultados:

$$ACIDEZ (^{\circ}D) = V \times 10$$

V: volumen en ml de solución de hidróxido de sodio N/9.

### **3.2.5.1.2-Materia grasa**

El contenido de materia grasa en leche se analizó en cada partida, según norma FIL-IDF 152 A: 1997 (32), sobre una muestra obtenida de la leche de arribo correctamente mezclada previo a la distribución en las mini tinas

Para dicha determinación se midieron 10 ml de ácido sulfúrico (densidad 1,82 a 15° C) y se colocaron en el butirómetro. Se adicionaron 11 ml de leche, se agregó 1 ml de alcohol amílico. Se tapó y se agitó hasta disgregar completamente el coágulo de caseína. Se centrifugó en centrífuga especial para butirómetro, se llevó nuevamente a baño maría a 65°C por 3 minutos y finalmente se ajustó el tapón hasta lograr que la línea inferior de la capa de grasa alcanzara la primera marca de la escala graduada. Se leyó directamente el valor en porcentaje de materia grasa.

### **3.2.5.1.3- Nitrógeno total (NT)**

La determinación de nitrógeno total (NT) sobre leche, se realizó de acuerdo a la norma FIL-IDF 20 B: 1993 parte 1 Método Kjeldahl (33)

Se tomó aproximadamente 1,5 y 2 g de muestra (pesada exactamente) para la mineralización. Esta etapa se llevó a cabo en una unidad digestora para seis tubos, con sistema de aspiración de humos (Digestión System 6, 1007 Digester, Tecator, Suecia). Se utilizaron 10 ml de ácido sulfúrico concentrado 98%, y una mezcla del catalizador, formado por  $\text{TiO}_2$  (0,14 g),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,14 g) y  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (4,7 g), por tubo y 2 ml de agua oxigenada de 100 volúmenes. Se procedió al mineralizado hasta que el líquido se tornó transparente y límpido. La destilación y titulación de las muestras se realizaron en forma manual. Para efectuar la destilación se trasvasó el contenido del tubo de digestión al balón de destilación, se agregaron gotas de fenolftaleína (solución al 1% en alcohol etílico al 96%), se conectó el balón. El medio se alcalinizó hasta viraje de la fenolftaleína con solución de NaOH al 50%. Se realizó la destilación por arrastre con vapor, recogiénose el amonio liberado en un erlenmeyer con 50 ml de ácido bórico al 4%, con 0,2 ml de indicador compuesto por rojo de metilo y azul de metileno (al 0,01 y 0.15 % respectivamente, en alcohol etílico 70 % v/v). El borato de amonio formado se titula con ácido sulfúrico 0,1 N (solución valorada)

El porcentaje de nitrógeno se calculó con la expresión:

$$\% N_T (\% \text{ p/p}) = \frac{V \cdot N \cdot 0,014}{M} * 100$$

Donde:

$\% N_T (\% \text{ p/p})$ : porcentaje de nitrógeno total por peso de muestra

V: volumen de solución de ácido valorado (ml)

N: normalidad de la solución de ácido (mq/ml)

0,014 masa equivalente de N en g/ml

M: masa de muestra (g)

Para expresar el resultado en porcentaje de proteína el valor obtenido se debe multiplicar por el factor 6,38.

Proteína Total=  $N_T \cdot 6,38$

#### **3.2.5.1.4- Determinación del contenido de caseína**

Esta determinación se realizó según FIL-IDF 29: 1966.(34) Para realizarla se colocó 10 ml de leche con 30 ml de agua a 40°C, luego se agregó 1 ml de ácido acético glacial, se agitó y después de unos minutos se agregó 1 ml de acetato de sodio para producir una buffer de pH 4,6. Se enrasa a 100 ml, se filtra y determina en el sobrenadante nitrógeno (nitrógeno no caseínico o nitrógeno soluble). El mismo se realizó como en 3.2.5.1.3

El contenido de caseína de la leche es igual a la diferencia entre la proteína total determinada en el punto 3.2.5.1.3 y la proteína soluble determinada en este punto.

El porcentaje de caseína se calculó con la expresión:

$$\% \text{ Caseína} = 6,38 ( \% N_T - \% N_S )$$

#### **3.2.5.1.5- Determinación de sólidos totales.**

Esta determinación se realizó según norma FIL- IDF21 B 1987 (35).

Se llevó la muestra a 40°C a fin de obtener una dispersión homogénea de la materia grasa en toda la leche, luego se tomó 5 g de leche, se colocaron en una cápsula de aluminio, previamente tarada y se llevó a un baño maría diseñado para tal

fin, por el lapso de 30 minutos. Pasado ese período se llevó a estufa a  $102 \pm 2^\circ\text{C}$  por 2 horas. Luego se enfrió en desecador y una vez frío se pesó.

El porcentaje de sólidos totales se calculó con la expresión:

$$\% S_T = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} * 100$$

Donde:

$m_0$ = masa del crisol vacío

$m_1$ = masa del crisol con muestra

$m_2$ = masa del crisol con muestra seca

#### **3.2.5.1.6-Determinación de pH de coagulación**

El pH de coagulación, se midió directamente en la tina de elaboración, previo a la adición de coagulante disuelto en buffer 5,5. Es decir en la leche pasteurizada, adicionada de fermento y de  $\text{CaCl}_2$  (en los casos que corresponde), a una temperatura de  $40^\circ\text{C}$ . La medición se realizó según se explicó en 3.3.1.1.

#### **3.2.5.1.7- Determinación de pH en la cuajada en el momento del moldeo y en el ingreso a la salmuera.**

Una vez realizado el lirado, se dejó la cuajada en tina donde se agitó suavemente para facilitar el desuerado. Cuando el secado de la cuajada fue el adecuado se suspendió la agitación y se dejó decantar. Luego se retiró el suero y la cuajada se colocó en sus respectivos moldes.

A pesar que la cuajada y el suero están compartiendo la misma tina, sus pH son distintos. En las cuatro elaboraciones los quesos fueron moldeados simultáneamente y la medición fue realizada en la cuajada una vez puesta en el molde. Cuando el pH del queso estaba en  $5,2 \pm 0,1$ , se desmoldó y se colocó en salmuera fría  $5 \pm 0,5$  °C.

#### **3.2.5.1.8- Determinación de pH en suero de moldeo**

La medición del pH de los sueros, fueron realizados según 3.3.1.1. sobre el suero presente en la tina con la cuajada en el momento del moldeo.

#### **3.2.5.1.9- Determinación de calcio en sueros con electrodo selectivo de calcio.**

Para esta determinación se utilizó el electrodo selectivo de calcio descrito en 3.1.5., pero en este caso se llevó a cabo tomando una alícuota de 10 ml del suero y trabajando a pH original del mismo, se enrasó a 50 ml en matraz aforado y se procedió luego como en la curva de calibrado.

Se realizaron determinaciones de calcio en los sueros extraídos de las tinas de elaboración y en los sueros exudados en la etapa de moldeo.

#### **3.2.5.2. Determinaciones realizadas en el queso al final de la maduración.**

#### **3.2.5.2.1- Muestreo y conservación de la muestra.**

El muestreo se realizó según norma FIL-IDF 50: 1980, como se describió en 3.1.1.

#### **3.2.5.2.2- Determinación de pH.**

Las determinaciones de pH en los quesos fueron realizadas después de 15 días de maduración, del mismo modo que en el punto 3.1.7.

#### **3.2.5.2.3- Determinación de humedad.**

Esta determinación se realizó de igual manera que en quesos comprados (punto 3.1.8).

#### **3.2.5.2.4- Tratamiento de la muestra para las determinaciones de calcio y fósforo**

El tratamiento de la muestra fue realizado según la AOAC Official Methods of Analysis (1995), según se describió en el punto 3.1.2.

#### **3.2.5.2.5- Determinación de calcio con electrodo selectivo de calcio.**

Esta determinación se llevo a cabo como en el punto 3.1.5., solo que aquí se utilizó la solución de la muestra preparada según 3.2.5.2.4.

### **3.2.5.2.6- Determinación de fósforo**

Se realizó colorimétricamente según el método de la AOAC Official Methods of Analysis 991.25 (1995 ). En el caso de los quesos elaborados se utilizó un volumen adecuado de la solución preparada en 3.3.2.4.

## **4- Resultados y discusión**

### **4.1- Determinaciones realizadas en quesos comerciales**

#### **4.1.1- Preselección de método para la determinación de calcio**

La primera técnica que utilizó EDTA y Calcón, donde se precipita el Mg a pH 12 como hidróxido, no pudo ser utilizada ya que el viraje del indicador en el punto final no se visualizaba correctamente debido a interferencias, dado la complejidad de la muestra y su tratamiento.

La segunda técnica donde se visualizó el punto final potenciométricamente, si bien arrojó buenos resultados, el desarrollo de cada determinación llevaba demasiado tiempo para el número de muestras a realizar en el presente trabajo, por lo que fue descartada.

En cuanto a la técnica volumétrica con permanganato de potasio (técnica de referencia para leche) en la que se tuvo que modificar el tratamiento de la muestra, para realizarla en queso, se lleva el mismo a cenizas tal como se describió en 3.1.2. La misma arrojó resultados altos, comparado con los valores obtenidos con las demás técnicas para queso blando. Por otro lado resultó ser una técnica muy tediosa para realizar muchas muestras, sobre todo en los pasos de precipitación, centrifugación y redisolución del precipitado de oxalato de calcio, por lo que también fue descartada.

Las dos técnicas preseleccionadas fueron la del electrodo selectivo de calcio y la de absorción atómica

Los resultados se muestran en la tabla 4-I

**Tabla 4-I: Preselección del método para la determinación de calcio**

Queso	Concentración de calcio en mg Ca/ 100 g de muestra				
	Volumétrico con EDTA		Volumético con KMnO <sub>4</sub>	Absorción Atómica	Electrodo selectivo de Calcio
	Calcón	Potenciométrico			
Empresa A	-	690,4	803,9	670,3	656,0
	-	715,3	790,8	686,2	626,9
	-	670,8	812,8	705,8	635,5
Empresa B	-	680,3	825,2	644,0	634,9
	-	725,2	830,6	660,2	655,5
	-	730,8	850,8	669,3	659,2

**4.1.2- Selección del método más conveniente para la determinación de calcio.**

Los dos métodos preseleccionados fueron comparados, de manera de realizar la selección del método de trabajo más adecuado. Los resultados se ven en la tabla 4-II.

**Tabla 4-II: Determinación de Ca por los dos métodos a seleccionar sobre muestra de quesos comerciales.**

<b>Queso</b>	<b>Concentración de Ca en mg Ca/100 g de muestra</b>	
	<b>Absorción Atómica</b>	<b>Electrodo selectivo de Calcio</b>
<b>Empresa nº 1</b>	566,8	569,3
	560,9	558,1
	556,7	551,0
<b>Empresa nº 2</b>	582,5	577,2
	574,6	565,4
	579,1	566,8
<b>Empresa nº 3</b>	719,1	715,2
	710,8	702,7
	720,5	708,3
<b>Empresa nº 4</b>	747,1	754,7
	762,7	764,4
	748,4	747,2
<b>Empresa nº 5</b>	516,3	509,6
	530,3	524,5
	515,0	504,9

Dado a que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los dos métodos (test de a pares: Anexo1) se selecciona el del electrodo selectivo de calcio, ya que es una técnica de bajo costo, fácil de instalar, desarrollar y mantener, por lo que es factible que cualquier empresa láctea pueda utilizarla. El método de Absorción Atómica, requiere un equipamiento costoso, tanto para su adquisición, como para su

uso y mantenimiento y para el que se tendrá que contar con personal capacitado para su utilización.

#### **4.1.3- Determinaciones de calcio en quesos comerciales realizadas con el electrodo selectivo.**

Se realizaron determinaciones sobre cinco marcas de queso cremoso de consumo masivo, elaborados por medianas y grandes empresas lácteas. A los 30 días se repitieron muestras de las mismas empresas a fin de tener más valores de calcio en quesos comerciales, aplicando la técnica seleccionada para trabajar en esta tesis. Los resultados se muestran en las tablas 4-III y 4-IV

## 4.1.3.1-Primera tanda

Tabla 4-III: Determinación de calcio en la primera tanda de quesos comerciales

<b>Queso marca</b>	<b>Concentración de Ca en mg Ca/100 g en base seca</b>			<b>Promedio Ca mg/100 g b.s.</b>
Empresa nº 1	1147,7	1124,9	1110,5	1127,7±18,7
<b>Empresa nº 2</b>	1120,3	1178,7	1181,6	1160,2±34,6
<b>Empresa nº 3</b>	1449,8	1424,3	1435,7	1436,6±12,7
<b>Empresa nº 4</b>	1595,6	1616,7	1579,4	1597,2±18,7
<b>Empresa nº 5</b>	1154,4	1188,1	1143,7	1162,1±23,7

#### 4.1.3.2-Segunda tanda

**Tabla 4-IV: Determinación de calcio en la segunda tanda de quesos comerciales**

<b>Queso marca</b>	<b>Concentración de Ca en mg Ca/100 g base seca</b>			<b>Promedio Ca mg/100 g b.s.</b>
<b>Empresa nº 1</b>	1188,2	1186,2	1163,3	1179,2±13,8
<b>Empresa nº 3</b>	1158,7	1151,6	1118,6	1142,9±21,4
<b>Empresa nº 3</b>	1441,7	1460,3	1419,7	1440,6±20,3
<b>Empresa nº 4</b>	1312,6	1303,4	1311,5	1309,2±5,0
<b>Empresa nº 5</b>	979,7	946,0	949,9	958,5±18,4

El calcio retenido en el queso está relacionado al proceso de producción y fundamentalmente con la calidad y variabilidad de la leche, por lo tanto su análisis puede darnos una idea de los parámetros de calidad y proceso que tiene la empresa.

Analizando los resultados de calcio en cada una de las tandas para cada empresa puede decirse que tres de las mismas tienen un mejor control de los

parámetros de producción, mientras que las otras dos han tenido variaciones de al menos algún parámetro de producción.

#### **4.1.4- Determinación de fósforo por espectrofotometría U.V.-Visible.**

En las mismas tandas de quesos utilizadas para la determinación de calcio, se realizó la determinación de fósforo por espectrometría UV.-Visible, para así poder hallar la relación Ca/ P y ver si se encuentra entre los valores deseados. Los resultados se muestran en las tablas 4-V y 4-VI

## 4.1.4.1-Primera Tanda

Tabla 4-V: Determinación de fósforo en la primera tanda de quesos comerciales

<b>Queso marca</b>	<b>Concentración de fósforo en mg P/100 g base seca</b>			<b>Promedio P mg P/ 100 g b.s.</b>
<b>Empresa nº 1</b>	909,9	937,2	900,8	915,9±15,5
<b>Empresa nº 2</b>	904,9	892,6	903,3	900,3±6,7
<b>Empresa nº 3</b>	1038,3	1028,0	1037,2	1034,5±5,6
<b>Empresa nº 4</b>	1121,0	1119,0	1115,4	1118,5±2,8
<b>Empresa nº 5</b>	866,3	895,9	881,6	881,3±14,8

## 4.1.4.2-Segunda Tanda

**Tabla 4-VI: Determinación de fósforo en la segunda tanda de quesos comerciales**

<b>Queso marca</b>	<b>Concentración de fósforo en mg P/100 g base seca</b>			<b>Proedio P mg P/ 100 g b.s.</b>
<b>Empresa nº 1</b>	903,8	914,6	893,8	904,1±10,4
<b>Empresa nº 2</b>	964,2	968,8	937,4	956,8±16,9
<b>Empresa nº 3</b>	1090,2	1085,2	1087,0	1087,5±2,5
<b>Empresa nº 4</b>	981,7	961,3	996,8	979,9±17,8
<b>Empresa nº 5</b>	809,3	804,9	780,9	798,3±15,3

La concentración de fósforo fue la esperada para este tipo de quesos.

Se puede ver una correlación directa entre la concentración de fósforo y la concentración de calcio para cada empresa. A pesar de ello, se ve también que la concentración de fósforo tiene menor oscilación que la concentración de calcio debido

a que, contrariamente a lo que ocurre con el calcio, un alto porcentaje del fósforo se encuentra unido químicamente a la caseína y por lo tanto es menos reactivo.

#### 4.1.5- Relación calcio fósforo

Como ya se dijo en la introducción (1.4), la relación de Ca/P óptima para un alimento es aquella que es mayor a 1, como se ve en la tabla 4-VII, esto se cumple, para los quesos comerciales analizados.

**Tabla 4-VII: Relación calcio fósforo de quesos comerciales**

Ca/P	Empresa nº 1	Empresa nº 2	Empresa nº 3	Empresa nº 4	Empresa nº 5
<b>Primera</b>					
<b>Tanda</b>	1,2	1,3	1,4	1,4	1,3
<b>Segunda</b>					
<b>Tanda</b>	1,3	1,2	1,3	1,3	1,2

Si bien los valores de calcio y fósforo de las empresas fueron diferentes, vemos que la relación Ca/P se mantiene para las cinco empresas dentro de los valores óptimos.

#### 4.1.6-Determinación de pH

Los valores de pH se encuentran en la tabla 4-VIII, estos son valores normales para este tipo de quesos (pH entre 5,0-5,4)

**Tabla 4-VIII: Determinación de pH de quesos comerciales**

<b>pH</b>	<b>Empresa nº 1</b>	<b>Empresa nº 2</b>	<b>Empresa nº 3</b>	<b>Empresa nº 4</b>	<b>Empresa nº 5</b>
<b>Primera Tanda</b>	5,33	5,32	5,44	5,47	5,31
<b>Segunda Tanda</b>	5,25	5,25	5,41	5,29	5,11

Si se analiza el pH del queso con la concentración de calcio y fósforo, surge una tendencia que permite asociar que a mayor pH final, mayor concentración de calcio en el queso. El fósforo tiene un comportamiento semejante pero con menos variaciones en la concentración. Para obtener conclusiones valederas se debería tener un universo mayor de muestras.

#### 4.1.7- Determinación de humedad

Se observa, en general, que una misma marca tiene poca variación de % de humedad y si bien una de ellas sobrepasa el límite superior, las demás cumplen con el Código Alimentario Argentino que define la humedad para este tipo de queso entre 46% y 55%.

Los valores obtenidos pueden observarse en la tabla 4-IX

**Tabla 4-IX: Determinación del % de humedad de quesos comerciales**

<b>%H</b>	<b>Empresa nº 1</b>	<b>Empresa nº 2</b>	<b>Empresa nº 3</b>	<b>Empresa nº 4</b>	<b>Empresa nº 5</b>
<b>Primera Tanda</b>	50,8	52,5	51,1	53,9	55,8
<b>Segunda Tanda</b>	50,5	52,2	50,5	50,1	56,3

Analizando los resultados no se puede encontrar una posible vinculación entre el % de humedad, pH y concentración de calcio y fósforo.

#### **4.2- Materia prima: Composición química de la leche utilizada en las elaboraciones**

Los resultados obtenidos se indican en la tabla 4-X

**Tabla 4-X Composición química de leche empleadas en las elaboraciones**

<b>Elaboración</b>	<b>PH</b>	<b>Acidez Dornic °D</b>	<b>% materia grasa</b>	<b>% sólidos totales</b>	<b>% proteínas totales</b>	<b>% proteína solubles</b>	<b>% caseína</b>
<b>Primera</b>	6,62	16,5	4,0	10,79	3,12	0,72	2,40
<b>Segunda</b>	6,76	15,0	3,8	11,10	3,13	0,74	2,39
<b>Tercera</b>	6,72	15,5	3,8	11,23	3,12	0,74	2,38
<b>Cuarta</b>	6,79	15,0	3,7	11,57	3,01	0,70	2,31
<b>Valores medios</b>	6,72	15,5	3,83	11,19	3,12	0,73	2,37

Como se puede observar, la característica físico-química de la leche no presenta entre cada elaboración variaciones importantes de los parámetros analizados. Esto era lo esperado ya que cuando la leche es tomada de los grandes silos de recibo, se minimiza la variación propia de cada tambo.

#### **4.3-Determinaciones realizadas**

##### **4.3.1- Determinaciones realizadas durante la elaboración.**

Durante las elaboraciones, se siguió la evolución del pH y cualitativamente el nivel de secado de la cuajada. Debido a que la mayor cantidad de suero se elimina en la tina de elaboración, por lo tanto la humedad del queso queda definida en esta

etapa. El grado de secado es un parámetro indicativo del momento en que la cuajada debe ser separada del suero y colocada en los moldes.

#### 4.3.1.1- Determinación de pH de la leche en tina.

El pH de coagulación se midió directamente en la tina de elaboración, es decir en leche pasteurizada, adicionada de fermento y del  $\text{CaCl}_2$  donde corresponde y a una temperatura de 40 °C, previo al agregado del cuajo. Los valores medidos se presentan en la tabla 4-XI

4-XI pH de leche la en tina

<b>pH</b>	<b>Queso testigo</b>	<b>Queso experim. 1</b>	<b>Queso experim. 2</b>	<b>Queso experim. 3</b>	<b>Queso experim. 4</b>
<b>1° elaboración</b>	6,36	6,46	6,31	6,12	6,14
<b>2° elaboración</b>	6,45	6,54	6,34	6,15	6,16
<b>3° elaboración</b>	6,50	6,54	6,40	6,20	6,20
<b>4° elaboración</b>	6,45	6,54	6,38	6,15	6,18

La diferencia de pH que se verifica entre la leche del queso testigo y los quesos experimentales I y II, se puede atribuir a la adición de diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ . Mientras que las leches de los quesos experimentales III y IV deben su bajo pH, además a la presencia del ácido glucónico, generado en la hidrólisis de la delta lactona.

#### 4.3.1.2- Determinación de pH en cuajada al momento de su ingreso al molde.

El seguimiento del pH en esta etapa adquiere importancia porque si disminuye mucho en la tina, la cuajada se desmineraliza demasiado, lo que trae aparejado defectos en la textura del queso. Esto se debe a que en las cuajadas ácidas los granos no se adhieren en el moldeo.

A pesar que la cuajada y el suero están compartiendo la misma tina, sus pH son distintos. Esto se debe a que en la formación del gel (coagulación y adquisición de firmeza) la red tridimensional formada por las caseínas y el calcio, se contrae expulsando la fase líquida y concentrando en su interior los glóbulos grasos y los microorganismos. Se estima que más del 90 % del fermento adicionado queda retenido en el queso. Esto hace que la cuajada(tabla-4-XII) se encuentre más acidificada al momento del moldeo que el suero (tabla 4-XIV). En las cuatro elaboraciones los quesos fueron moldeados simultáneamente.

En la tabla 4-XII se indican los valores de pH de las cuajadas de todas las elaboraciones, el mismo fue medido sobre la cuajada colocada en el molde.

**pH de la cuajada al momento de su ingreso al molde.**

<b>pH</b>	<b><i>Queso testigo</i></b>	<b><i>Queso experim. 1</i></b>	<b><i>Queso experim. 2</i></b>	<b><i>Queso experim. 3</i></b>	<b><i>Queso experim. 4</i></b>
<b>1º elaboración</b>	6,26	6,34	6,17	6,0	6,0
<b>2º elaboración</b>	6,27	6,36	6,18	6,03	6,03
<b>3º elaboración</b>	6,29	6,35	6,17	6,02	6,0
<b>4º elaboración</b>	6,26	6,36	6,22	6,0	6,01

Si se comparan los valores de pH de la leche en tina (tabla 4-XI) con los de la cuajada (tabla 4-XII) se puede ver para cada elaboración que el pH descendió. Cabe aclarar, como ya se indico antes, que en las dos últimas elaboraciones, se disminuyó a la mitad la cantidad de fermento agregado, de esta manera se consiguió aumentar el tiempo en tina, incrementar el desuerado sin afectar el pH final, ya que la acidificación producida por bacterias lácticas inoculadas como fermento debe producirse fundamentalmente en el moldeo y no en la tina de elaboración, consiguiendo de este modo, un mejor desuerado y por consiguiente una disminución de la humedad de los quesos ( tabla 4-XVII).

**4.3.1.3- Determinación de pH en cuajada al momento de su ingreso a salmuera.**

En los quesos de alta humedad, como el cremoso, la lactosa retenida en la cuajada y las bacterias lácticas, pueden hacer que el pH descienda a valores menores a 5. En dicha condición aparecen graves problemas de texturas (“arricotamiento”) que, lleva a la pérdida de un atributo muy importante en estos quesos como es la capacidad de fundir y cubrir cuando se emplea en comidas donde se busca un gratinado. Por esto el

pH de ingreso a salmuera debe ser de  $5,15 \pm 0,1$ . Teniendo en cuenta que la salmuera detiene el desarrollo de los microorganismos, si se dispone de mucha capacidad de enfriamiento, el pH del queso debe ser el indicado. Por el contrario, si se dispone de poca capacidad de enfriamiento, el pH de ingreso a salmuera deberá ser mayor porque un enfriamiento lento provocará que el pH siga descendiendo.

La tabla 4-XIII contiene los pH de los quesos elaborados en el ingreso a la salmuera.

**Tabla 4-XIII registro del pH al ingreso a salmuera**

<b>pH</b>	<b>Queso testigo</b>	<b>Queso experim. 1</b>	<b>Queso experim. 2</b>	<b>Queso experim. 3</b>	<b>Queso experim. 4</b>
<b>1° elaboración</b>	5,19	5,19	5,20	5,19	5,02
<b>2° elaboración</b>	5,17	5,15	5,20	5,10	5,00
<b>3° elaboración</b>	5,19	5,17	5,19	5,15	5,03
<b>4° elaboración</b>	5,18	5,17	5,19	5,10	5,05

El queso experimental 4 tuvo una mayor velocidad de acidificación y esto hizo que ingrese a la salmuera a un pH más ácido que los demás.

#### **4.3.1.4- Determinación de pH en sueros**

En el momento en que la cuajada fue colocada en los moldes se registraron los pH de los respectivos sueros, los valores se encuentran en la tabla 4-XIV

**Tabla 4-XIV pH de sueros de moldeo**

<b>pH</b>	<b>Suero testigo</b>	<b>Suero experim.1</b>	<b>Suero experim. 2</b>	<b>Suero experim. 3</b>	<b>Suero experim. 4</b>
<b>1º elaboración</b>	6,32	6,40	6,22	6,01	6,04
<b>2º elaboración</b>	6,29	6,37	6,20	6,04	6,04
<b>3º elaboración</b>	6,32	6,43	6,21	6,07	6,04
<b>4º elaboración</b>	6,33	6,46	6,27	6,06	6,06

Los sueros de los quesos experimentales 3 y 4 son ácidos, porque se partió de una leche acidificada con  $\delta$  Lactona.

Si se comparan los valores de pH de los sueros al momento del moldeo con los de la leche en tina (tabla 4-XI), se puede apreciar un ligero descenso debido a la actividad del fermento. Si se compara el pH del suero en el momento del moldeo con la cuajada (tabla 4-XII) se ve que éstas últimas son más ácidas que sus respectivos sueros, como ya se dijo, debido a que el fermento adicionado en la elaboración queda mayoritariamente retenido en el queso.

#### **4.3.1.5- Determinación de calcio en suero**

El Calcio se determinó en una alícuota de suero que se obtuvo en el momento de separar la cuajada. Los valores obtenidos están expresados en la tabla 4-XV

**Tabla 4-XV: concentración de calcio en suero**

<b>[Ca] ppm</b>	<b>Suero testigo</b>	<b>Suero experim.1</b>	<b>Suero experim. 2</b>	<b>Suero experim. 3</b>	<b>Suero experim. 4</b>
<b>1º elaboración</b>	159	116,0	202,0	227,5	204,0
<b>2º elaboración</b>	155,1	122,0	200,5	220,1	207,5
<b>3º elaboración</b>	157,5	116,2	199,4	218,8	211,5
<b>4º elaboración</b>	148,3	111,3	189,3	212,6	194,2
<b>Promedios</b>	155,9±5	116,3±4	197,8±6	219,7±6	204,3±7

También se realizaron determinaciones de calcio en sueros que drenan del moldeo en la etapa de acidificación de la cuajada y los resultados arrojados no tuvieron diferencias significativas con los sueros de la tina al momento del moldeo (tabla 4-XV).

Como puede observarse el suero del queso experimental 2 posee una mayor concentración de calcio si lo comparamos con el testigo y el queso experimental 1, como la única diferencia ha sido la cantidad de cloruro de calcio agregado en la elaboración se debe atribuir a que dicha variación se debe a esto.

Si se compara para cada experiencia las concentraciones de calcio en suero de cada elaboración (tabla 4-XV) se puede observar que la variabilidad no es significativa. Cuando se analiza la influencia del agregado de  $\text{CaCl}_2$  se ve que la menor cantidad de calcio se encuentra en el suero del queso experimental 1 (116,3±4 ppm) y se incrementa con el agregado de  $\text{CaCl}_2$ : testigo (155,9±5 ppm) y experimental 2 (197,8±6 ppm). Estos valores medios son estadísticamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Si bien el  $\text{CaCl}_2$  se agrega para favorecer la coagulación de la leche, se ve que cuanto mayor es la concentración agregada, mayor es la pérdida con el suero.

Si analizamos el efecto de la acidificación inicial de la leche de elaboración comparando el queso testigo (155,9±5 ppm Ca) y el exp III (219,7±6 ppm Ca) vemos

que las concentraciones son significativamente diferentes, debido a que la acidificación lleva a una desmineralización de la caseína, incrementando la concentración de calcio iónico en la fase acuosa, que se traduce en una mayor pérdida en el suero.

Si comparamos los quesos experimentales 3 y 4 entre ellos y con el testigo, todos elaborados con igual concentración de  $\text{CaCl}_2$ , podemos decir que esa diferencia de concentración de calcio en suero atribuible al menor pH de la leche al momento de la coagulación. El tratamiento térmico afectaría en menor medida.

Cuando se evalúa el efecto del calentamiento superior a la temperatura de pasteurización, queso exp III ( $219,7 \pm 6$  ppm Ca) y exp IV ( $204,3 \pm 7$  ppm Ca), surge que los valores medios de calcio en suero son estadísticamente menores en los tratados térmicamente, atribuible a la formación de fosfato tricalcico precipitado en la superficie de intercambio caliente como “piedra de leche”.

#### **4.3.2- Determinaciones realizadas sobre el queso al final de la maduración.**

##### **4.3.2.1- Determinación de pH**

El pH de los quesos después de 15 días de maduración se ven en la tabla 4-XVI

**Tabla 4-XVI: pH de quesos maduros**

<b>pH</b>	<b><i>Queso testigo</i></b>	<b><i>Queso experim. 1</i></b>	<b><i>Queso experim. 2</i></b>	<b><i>Queso experim. 3</i></b>	<b><i>Queso experim. 4</i></b>
<b>1º elaboración</b>	5,15	5,06	5,03	4,98	4,87
<b>2º elaboración</b>	5,05	5,03	5,07	4,98	4,81
<b>3º elaboración</b>	5,19	5,18	5,10	5,22	5,01
<b>4º elaboración</b>	5,23	5,39	5,58	5,46	5,12

En la tabla 4-XVI, los pH de las dos primeras elaboraciones son más bajos que los de las dos últimas, donde se empleó la mitad de la concentración de fermento. Esto es atribuible fundamentalmente a que un exceso de fermento lleva a una velocidad de acidificación en molde muy rápida. Debido a esto el enfriamiento al que fueron sometidos los quesos en el salado no llegaron a bloquear el desarrollo de microorganismos y por lo tanto de la acidez que hace que el pH del queso al final de la maduración sea menor al de su ingreso a salmuera (tabla 4-XV).

Cuando se redujo el fermento, la velocidad de acidificación disminuyó y el descenso del pH se pudo controlar en la etapa de salado.

En estas experiencias donde el período de maduración fue de 15 días en lugar de 30, no se logro visualizar que el pH de los quesos al final de la maduración sean mayores a los de la cuajada en el ingreso a la salmuera, como indica la bibliografía debido probablemente a que en ese corto período de tiempo no se completaron las transformaciones químicas, fundamentalmente la proteolisis. (36)

#### **4.3.2.2-Humedad.**

La humedad en los quesos cremosos (no cocido, no prensado) queda determinada por el secado de la cuajada en tina y por la eliminación de suero en molde durante la acidificación. Si la acidificación es muy rápida, el queso retiene más suero y la humedad final del queso es mayor. Por el contrario cuando la acidificación en molde es demasiado lenta el queso tiende a perder demasiado suero y disminuye su humedad.

En la tabla 4-XVII, se ve que la humedad de las dos primeras elaboraciones fue ligeramente mayor a las dos restantes, esto está asociado directamente a la velocidad de acidificación que fue mayor cuando se empleó mayor concentración de fermento. A pesar de ello si se analiza la humedad del testigo con los quesos experimentales 1,2 y 3 no son estadísticamente diferentes, mientras que la humedad del queso experimental 4 es estadísticamente mayor a los restantes quesos.

**Tabla 4-XVII: % Humedad de quesos**

<b>%H</b>	<b>Queso testigo</b>	<b>Queso experim. 1</b>	<b>Queso experim. 2</b>	<b>Queso experim. 3</b>	<b>Queso experim. 4</b>
<b>1º elaboración</b>	58,3	60,6	57,9	59,2	64,6
<b>2º elaboración</b>	58,0	59,0	57,4	56,9	64,6
<b>3º elaboración</b>	53,2	55,5	54,8	54,7	63,2
<b>4º elaboración</b>	57,6	57,6	55,9	56,9	62,4

Para las dos últimas elaboraciones los % de humedad en general disminuyeron. El queso experimental 4 se caracterizó por tener mayor % de humedad en todos los casos, tener consistencia muy blanda, que hacía más difícil su manejo.

#### **4.3.2.3- Rendimiento**

Se calculó el rendimiento de los quesos, expresados en la tabla 4-XVIII, según la siguiente fórmula:

$$R = \frac{\text{Peso del queso}}{\text{volumen de leche}} * 100$$

**Tabla 4-XVIII: rendimiento de los quesos**

<b>R en g l<sup>-1</sup> %</b>	<b>Queso testigo</b>	<b>Queso experim. 1</b>	<b>Queso experim. 2</b>	<b>Queso experim. 3</b>	<b>Queso experim. 4</b>
<b>1º elaboración</b>	16,0	17,6	17,2	16,6	22,0
<b>2º elaboración</b>	17,0	18,4	16,6	16,4	21,2
<b>3º elaboración</b>	14,6	14,9	15,7	13,4	19,1
<b>4º elaboración</b>	14,6	13,8	15,8	12,8	18,2

La disminución de rendimiento en las dos últimas elaboraciones está asociada con un menor porcentaje de humedad de los quesos. Esto fue posible porque la reducción de la concentración de fermento permitió controlar mejor el desuerado en tina. Como era esperable el rendimiento del queso experimental 4 fue mayor debido a que el tratamiento térmico hizo que las proteínas del suero se desnaturalicen y queden retenidas en el queso. Mientras que en el testigo, experimental 1, 2 y 3 las proteínas en estado nativo solubles se eliminaron con el suero.

Las proteínas del suero retenidas en el queso inmovilizan agua por lo que aumenta la humedad. El aumento de rendimiento en el queso experimental 4 se debe fundamentalmente a dos factores: a la retención de proteínas del suero de mayor valor biológico que la caseína y a la retención de agua (37).

#### 4.3.2.4-Determinación de calcio en el queso

##### 4.3.2.4.1-. Primera elaboración.

**Tabla 4-XVIX: Concentración de calcio**

Tipo de queso	Concentración de calcio mg/100g			Promedio de Ca mg/100g
<b>Queso Testigo</b>	1093,1	1097,4	1100,0	1096,8±3,5
<b>Queso Experimental1</b>	832,8	843,5	853,4	843,2±10,3
<b>Queso experimental 2</b>	1036,0	1042,5	1033,7	1037,4±4,5
<b>Queso experimental 3</b>	832,4	843,0	834,9	836,8±5,5
<b>Queso experimental 4</b>	756,4	778,7	768,0	767,7±11

## 4.3.2.4.2-. Segunda elaboración.

Tabla 4-XX: Concentración de calcio

Tipo de queso	Concentración de calcio mg/100g			Promedio de Ca mg/100g
<b>Queso testigo</b>	1072,7	1071,0	1073,2	1072,3±1,1
<b>Queso experimental 1</b>	839,4	846,6	854,6	846,8±7,6
<b>Queso experimental 2</b>	1144,2	1151,8	1140,8	1145,6±5,6
<b>Queso experimental 3</b>	992,6	1008,5	1002,6	1001,3±7,9
<b>Queso experimental 4</b>	681,4	707,3	686,5	691,7±13,7

## 4.3.2.4.3-. Tercera elaboración

Tabla 4-XXI: Concentración de calcio

Tipo de queso	Concentración de calcio mg/100g			Promedio de Ca mg/100g
<b>Queso testigo</b>	1263,7	1273,7	1288,2	1275,2±12,3
<b>Queso experimental 1</b>	1132,0	1156,4	1193,2	1160,5±30,8
<b>Queso experimental 2</b>	1261,6	1271,7	1298,8	1277,4±19,2
<b>Queso experimental 3</b>	1042,0	1060,0	1091,4	1064,5±25
<b>Queso experimental 4</b>	815,4	828,2	788,3	810,6±20,2

#### 4.3.2.4.4- Cuarta elaboración.

**Tabla 4-XXII: Concentración de calcio**

<b>Tipo de queso</b>	<b>Concentración de calcio mg/100g</b>			<b>Promedio de Ca mg/100g</b>
<b>Queso testigo</b>	1308,9	1289,6	1273,2	1290,5±17,9
<b>Queso experimental 1</b>	1236,8	1235,6	1237,0	1236,5±0,75
<b>Queso experimental 2</b>	1210,9	1218,8	1188,0	1205,9±15,9
<b>Queso experimental 3</b>	1276,1	1274,9	1264,7	1271,9±6,3
<b>Queso experimental 4</b>	1013,3	1006,4	969,7	996,5±23,4

#### 4.3.2.4.5-Análisis de los resultados de calcio

Se evaluó la incidencia de la concentración de calcio y del fermento en los quesos testigo, experimental 1 y experimental 2. Para ello, se aplicó Anova de 2 vías,

Factor 1: agregado de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  (Anexo 2)

S: sin  $\text{Cl}_2\text{Ca}$

T: con agregado de 0,4 g/l  $\text{Cl}_2\text{Ca}$

D: con agregado de 0,8 g/l  $\text{Cl}_2\text{Ca}$

Factor 2: agregado de fermento

F: fermento

M: mitad de la cantidad de F

Del análisis surge que la retención de calcio en el queso es significativamente mayor en los elaborados con menor concentración de fermento. Esto se debe asociar a que un mayor agregado de fermento produce una leve acidificación en tina que lleva a la desmineralización de la caseína y da origen a quesos con menor cantidad de calcio y a sueros con mayor concentración de este catión.

Por otra parte se puede observar que la adición de 0,4 g  $\text{CaCl}_2 \text{ l}^{-1}$ , mejora significativamente el contenido de calcio en el queso. Mayores concentraciones de la sal no mejoran la concentración de calcio en el queso al final de la maduración, pero incrementa su concentración en suero.

A continuación en elaboraciones con leche pasteurizada, adicionada con  $\text{CaCl}_2$ , comparando los quesos testigo y experimental 3, se evaluó la incidencia de la acidez de la leche en el momento de la coagulación en cuanto al contenido de calcio en el queso maduro. Se compararon las medias con un test de hipótesis (Anexo 3). Los tratamientos a comparar fueron:

Trat. a: queso experimental 3 de tercera y cuarta elaboración (temperatura normal y mitad del fermento, acidificado con  $\delta$  lactona)

Trat. b: Queso testigo de tercera y cuarta elaboración (mitad de fermento).

Del análisis surge que se obtiene una mayor concentración de calcio en quesos, cuando se trabaja con leche con la acidez no modificada. La acidificación que puede

sufrir la leche por conservación deficiente, afecta negativamente a la retención de calcio en el queso final. Esto se debe atribuir a la desmineralización de la micela de caseína, pasando el calcio a la fase acuosa (6)

Para evaluar el efecto del tratamiento térmico superior a la temperatura de pasteurización, se realizó el queso experimental 4. Debido a que este calentamiento afecta fuertemente a la coagulación y a fin de mantener los parámetros tecnológicos en valores normales, se adicionó  $\text{CaCl}_2$  y se bajó el pH.

A fin de evidenciar sólo el efecto del tratamiento térmico sobre la concentración de calcio, el queso experimental 4 se comparó con el queso experimental 3. Para ello se efectuó un análisis de la varianza, Anova, 1 factor: tipo de tratamiento (anexo 4).

Para dicho análisis se denominó:

a: queso experimental 4 de primera y segunda elaboración (temperatura alta y fermento)

b: queso experimental 3 de primera y segunda elaboración (temperatura normal y fermento).

c queso experimental 3 tercera y cuarta elaboración (temperatura normal y mitad del fermento).

d: queso experimental 4 tercera y cuarta elaboración (temperatura alta y mitad del fermento).

Los resultados indican que los quesos elaborados con leche sometida a tratamiento térmico a una temperatura superior a la de pasteurización tienen una concentración de calcio significativamente menor comparado con los quesos elaborados con leche pasteurizada. También queda evidenciado que una

concentración menor de fermento incrementa significativamente la concentración del mineral en los quesos evaluados.

Sintetizando lo analizado se puede afirmar que las condiciones más adecuadas para obtener una alta concentración de calcio en queso al final de la maduración son:

- 0,4 g  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ .  $\text{l}^{-1}$ . Esto significa que el agregado de  $\text{CaCl}_2$  a la leche mejora el contenido de calcio en el queso hasta un cierto límite, superado el mismo el exceso se pierde en el suero
- Baja cantidad de fermento. Es decir que el fermento debe aportar los microorganismos para repoblar la leche pasteurizada, ganar el medio y garantizar una correcta acidificación en el molde. Pero si por un agregado excesivo de fermento la acidez disminuye marcadamente en la tina de elaboración, se obtienen quesos con menor concentración de calcio.
- Sin desarrollo de acidez. La leche con acidez desarrollada da origen a quesos con baja concentración de calcio, debido a la desmineralización de la caseína en la tina.
- Baja temperatura: El tratamiento térmico a temperatura superior a la de pasteurización, genera dos efectos que llevan a que el queso tenga menor cantidad de calcio al final de la maduración: Por un lado debido a este tratamiento térmico se incorporan en el queso proteínas del suero que no aportan calcio y por otro lado el calentamiento genera desequilibrio salino a nivel de micela caseínica que indudablemente también afectan negativamente en la retención del calcio en el queso.

Recordemos que estas condiciones de elaboración, son las del queso testigo.

#### 4.3.2.5. Determinación de fósforo en el queso

##### 4.3.2.5.1-Primera elaboración

**Tabla 4-XXIII: Concentración de fósforo**

Tipo de queso	Concentración de fósforo mg/100g			Promedio de P mg/100g
<b>Queso testigo</b>	763,4	767,3	767,8	766,2±2,4
<b>Queso experimental 1</b>	694,2	702,2	691,8	696,1±5,4
<b>Queso experimental 2</b>	760,1	749,4	772,4	760,6±11,5
<b>Queso experimental 3</b>	703,4	708,6	699,6	703,8±4,5
<b>Queso experimental 4</b>	662,2	686,4	679,1	675,9±12,4

## 4.3.2.5.2- Segunda elaboración

Tabla 4-XXIV: Concentración de fósforo

Tipo de queso	Concentración de fósforo mg/100g			Promedio de P mg/100g
<b>Queso testigo</b>	765,0	793,3	791,4	783±15,8
<b>Queso experimental 1</b>	662,9	656,8	680,5	666,7±12,3
<b>Queso experimental 2</b>	814,4	807,8	790,8	804,3±12,2
<b>Queso experimental 3</b>	773,4	782,4	775,5	777,1±4,7
<b>Queso experimental 4</b>	615,5	608,2	585,3	603,0±15,7

## 4.3.2.5.3- Tercera elaboración

Tabla 4-XXV: Concentración de fósforo

Tipo de queso	Concentración de fósforo mg/100g			Promedio de P mg/100g
<b>Queso testigo</b>	897,6	897,9	901,3	898,9±2
<b>Queso experimental 1</b>	894,6	918,5	910,3	907,8±12
<b>Queso experimental 2</b>	870,3	853,4	847,1	856,9±12
<b>Queso experimental 3</b>	827,9	840,4	846,4	838,2±9
<b>Queso experimental 4</b>	706,3	696,7	691,6	698,2±7,5

## 4.3.2.5.4-Cuarta elaboración

Tabla 4-XXVI: Concentración de fósforo

Tipo de queso	Concentración de fósforo mg/100g			Promedio de P mg/100g
<b>Queso testigo</b>	848,5	854,2	862,9	855,2±7,2
<b>Queso experimental 1</b>	870,7	879,5	876,3	875,4±4,6
<b>Queso experimental 2</b>	884,1	894,6	844,7	874,5±26,3
<b>Queso experimental 3</b>	859,6	877,0	873,8	870,1±9,2
<b>Queso experimental 4</b>	799,7	761,7	780,5	780,6±19

## 4.3.2.5.5-Análisis de los resultados de fósforo

La incidencia de adición de  $\text{CaCl}_2$  y de fermento en la concentración de fósforo en queso, se evaluó comparando los quesos testigo, experimental 1 y experimental 2. Para ello, se aplicó un Anova de 2 vías: (Anexo 5)

Factor 1: agregado de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$

T: con agregado de  $0,4 \text{ g Ca Cl}_2 \text{ l}^{-1}$

S: sin  $\text{Cl}_2\text{Ca}$

D: con agregado de  $0,8 \text{ g CaCl}_2 \text{ l}^{-1}$

Factor 2: agregado de fermento

1: fermento

2: mitad de la cantidad de F

Del análisis surge que la mayor retención de fósforo se logra con la menor dosis de fermento, coincidentemente con lo obtenido cuando se estudió el calcio retenido en queso.

Por otra parte el agregado de  $0,4 \text{ g CaCl}_2 \text{ l}^{-1}$  incrementa el contenido de fósforo en queso, pero no se modifica significativamente agregando más calcio.

Estos resultados estarían indicando que el agregado de calcio incrementaría indirectamente la concentración de fósforo en el queso por lo que la relación Ca/P no sufriría grandes variaciones.

Cuando se evaluó el efecto de la acidificación de la leche de elaboración, se evaluaron los quesos testigo y el experimental 3. Se compararon las medias con un test de hipótesis. Los tratamientos a comparar fueron (Anexo 6):

Queso testigo de tercera y cuarta elaboración (mitad de fermento).

Queso experimental 3 de tercera y cuarta elaboración (temperatura normal y mitad del fermento, acidificado con  $\delta$  lactona)

Del análisis surge que no hay diferencias estadísticamente significativas cuando se trabaja con leche con acidez desarrollada, lo que indicaría que la concentración de fósforo en el queso final no depende de este parámetro

Para evaluar el efecto del tratamiento térmico superior en la retención de fósforo en los quesos, se compararon los quesos experimental 3 y experimental 4, que sólo se diferencian en la temperatura a la que es sometida la leche de elaboración.

Se Aplicó un análisis de la varianza Anova 1 factor: tipo de tratamiento.

(Anexo 7) Para dicho análisis se denominó:

a: queso experimental 4 de primera y segunda elaboración (temperatura alta y fermento)

b: queso experimental 3 de primera y segunda elaboración (temperatura normal y fermento)

c queso experimental 3 tercera y cuarta elaboración (temperatura normal y mitad del fermento)

d: queso experimental 4 tercera y cuarta elaboración (temperatura alta y mitad del fermento)

Del análisis de los resultados surge que los quesos elaborados con leche sometida a tratamiento térmico superior a la pasteurización tiene un contenido de fósforo significativamente menor a los elaborados con leche pasteurizada.

Si se analizan globalmente las condiciones en la que se retiene más fósforo, salvo la acidificación de la leche que no afecta, los demás parámetros son coincidentes con las consideraciones hechas para calcio.

Esto permite suponer que todas acciones estudiadas tendiente a incrementar el calcio, lleva aparejado idéntico efecto en la retención de fósforo.

#### 4.3.2.6-Relación calcio fósforo en el queso

**Tabla 4-XXVII: Relación Ca/P**

<b>Ca/P</b>	<i>Queso testigo</i>	<i>Queso experimen. 1</i>	<i>Queso experimen. 2</i>	<i>Queso experimen. 3</i>	<i>Queso experimen. 4</i>
Primera elaboración	1,43	1,21	1,23	1,18	1,14
Segunda elaboración	1,36	1,27	1,42	1,29	1,15
Tercera elaboración	1,42	1,35	1,37	1,27	1,16
Cuarta elaboración	1,51	1,41	1,38	1,46	1,28

La absorción intestinal del calcio está íntimamente ligada a la presencia de fósforo: la relación Ca/P debe oscilar entre 0,5 y 2, siendo la ideal una relación mayor a 1.

En efecto, un exceso de fosfatos precipita el calcio, lo cual hace que no pueda absorberse. La absorción intestinal de calcio se ve favorecida por la presencia de vitamina D y lactosa, de ahí el interés que tienen la leche y los productos lácteos para cubrir la necesidad cálcica. La leche y el queso tienen una relación Ca/P ideal comprendida entre 1 y 1,4.

Como se ve en tabla 4-XXVII la relación Ca/P en todos los casos fue buena, logrando un mejoramiento cuando se bajó la concentración de fermento, sobretodo para los quesos elaborados con leche ácida. En el caso del queso testigo en todas las elaboraciones, se obtuvo una buena relación Ca/P

## Conclusiones

- De todas las técnicas empleadas en la determinación de calcio, las que arrojaron mejores resultados fueron la del electrodo selectivo de calcio y la de Absorción Atómica.
- Se adoptó evaluar calcio con electrodo selectivo ya que cuando se compararon los resultados con los obtenidos por absorción atómica, no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Además este método mostró importantes ventajas, ya que es una técnica de bajo costo, fácil de instalar, desarrollar y mantener frente a la de Absorción Atómica cuyo equipamiento es costoso y que requiere personal especializado para su uso y mantenimiento. El electrodo selectivo puede ser fácilmente utilizado en la industria o en cualquier organismo de control regional de alimentos.
- Cuando se analizaron quesos comerciales, a pesar de no responder a un muestreo exhaustivo, se encontraron diferencias importantes de la concentración de calcio y fósforo para las distintas empresas. Además, cuando se repitió el muestreo a los 30 días algunas empresas mostraron variaciones importantes entre sus valores. A pesar de estas oscilaciones la relación Ca/P para todos los quesos comerciales estuvo comprendida entre 1,2 y 1,4.
- La composición de la leche empleada en las elaboraciones, por provenir de los silos de recibo, tuvo mínimas variaciones, lo que permite sacar conclusiones de los quesos elaborados.
- La práctica de agregar  $\text{CaCl}_2$  en la leche de elaboración, ejercida por la industria de nuestro país, es favorable para incrementar el contenido de calcio y

fósforo en los quesos al final de la elaboración. Cuando este agregado es elevado (mayor a  $0,4\text{gCaCl}_2\cdot\text{l}^{-1}$ ), el exceso se pierde en suero, como muestra el análisis de los quesos testigo, experimental 1 y experimental 2. De dicho análisis, también queda evidenciado que el agregado de una alta concentración de fermento de adición directa en tina afecta negativamente en la retención de los minerales estudiados.

- El empleo de leche con acidez desarrollada reduce la concentración de calcio en el queso, pero en el rango estudiado no afecta la concentración de fósforo. La acidificación de la leche y/o la cuajada en tina, llevan a una reducción de calcio en el queso, mientras que no tiene incidencia la acidificación en el molde.
- Todo tratamiento térmico a temperatura superior a la de pasteurización incrementa el rendimiento quesero, pero afecta negativamente en la retención de calcio y fósforo en los quesos.
- Los quesos experimentales elaborados en planta piloto tuvieron valores de calcio y fósforo ubicados en el rango de valores encontrados en quesos comerciales.

## **Anexo curva de calibrado electrodo de calcio**

## Curva de Calibrado Electrodo de Calcio

mg.l-1 Ca	log C	E	
	1	0	-38,5
	5	0,69897	-19,8
	10	1	-11,6
	50	1,69897	8,4
	100	2	16,8

## Resumen

---

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99986902
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99973806
R <sup>2</sup> ajustado	0,99965075
Error típico	0,41389791
Observaciones	5

---

## ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	1961,51807	1961,51807	11450,0095	1,7994E-06
Residuos	3	0,51393444	0,17131148		
Total	4	1962,032			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>
Intercepción	-38,8968761	0,3356174	-115,896484	1,4163E-06	-39,9649604	-37,8287918	-39,9649604
Variable X 1	27,7484337	0,25931972	107,004717	1,7994E-06	26,9231626	28,5737048	26,9231626

## Anexo curva de calibrado de fósforo

Determinación de Fósforo

Curva de calibrado

mg.l-1 P	%T	A
0	100	0
0,8	84,6	0,07262964
2	66	0,18045606
4	44,3	0,35359627
6	30,3	0,51855737
8	20,3	0,69250396

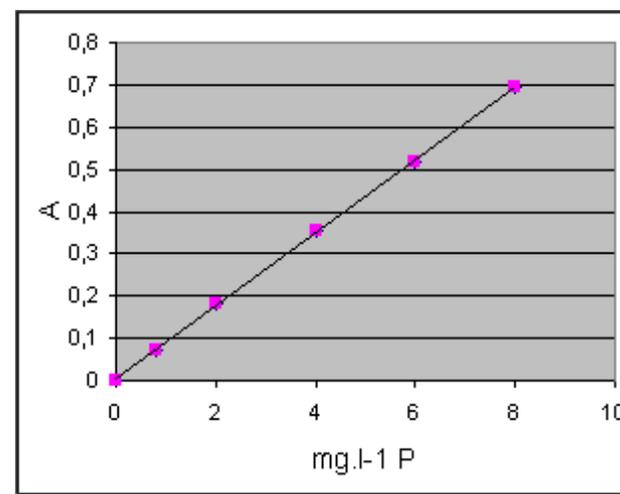
Resumen

---

### Estadísticas de la regresión

---

Coefficiente de correlación múltiple	0,99991176
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99982352
R <sup>2</sup> ajustado	0,9997794
Error típico	0,00398891



Observaciones	6
---------------	---

## ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0,36057116	0,36057116	22661,1747	1,168E-08
Residuos	4	6,3646E-05	1,5911E-05		
Total	5	0,36063481			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>
Intercepción	0,00415245	0,00256746	1,61733648	0,18111384	-0,00297597	0,01128087	-0,00297597
Variable X 1	0,08619368	0,00057258	150,53629	1,168E-08	0,08460395	0,08778341	0,08460395



### Anexo 1 Test de a pares para comparar los Métodos Analíticos

A.A.	E.S.	Diferencia
561,5	559,5	2
578,7	569,6	9,1
716,8	708,7	8,1
750,7	755,4	- 4,7
520,5	513	7,5

Ho)  $u_1 = u_2$

H1)  $u_1 \neq u_2$

La media de las diferencias = 4,4

La desviación estándar de las diferencias= 5,78705

T calculado =  $7,4 * \sqrt{5/1,41067}$

T calculado = 1,7007

De tablas T crítico = 2,7765 ( $p= 0,05$  y 4 grados de libertad)

Como T calculado es menor al T critico, se acepta la hipótesis nula Ho, entonces no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias obtenidas por los dos métodos analíticos.

**Anexo 2****Anova de 2 vías Factor 1: Agregado de CaCl<sub>2</sub>**

Analysis of Variance for Datos Ca -

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A:Cant. Fermento	520899,0	1	520899,0	181,73	0,0000
B:Tratamiento	200687,0	2	100344,0	35,01	0,0000
RESIDUAL	91723,3	32	2866,35		
TOTAL (CORRECTED)	813310,0	35			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of Datos Ca into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since 2 P-values are less than 0,05, these factors have a statistically significant effect on Datos Ca at the 95,0% confidence level.

Multiple Range Tests for Datos Ca by Cant. Fermento

Method: 95,0 percent LSD

Cant. Fermento Count    LS Mean            Homogeneous Groups

---

F	18	1006,99	X
M	18	1247,57	X

---

Contrast	Difference	+/- Limits
F - M	*-240,578	36,3514

---

\* denotes a statistically significant difference.

#### The StatAdvisor

---

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 1 pair, indicating that this pair shows a statistically significant difference at the 95,0% confidence level. At the top of the page, 2 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Fisher's least significant difference (LSD) procedure. With this method, there is a 5,0% risk of calling each pair of means significantly different when the actual difference equals 0.

#### Multiple Range Tests for Datos Ca by Tratamiento

---

Method: 95,0 percent LSD

Tratamiento	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
s	12	1021,78	X
d	12	1176,31	X

---

t            12        1183,75        X

---

Contrast	Difference	+/- Limits
d - s	*154,533	44,5212
d - t	-7,44167	44,5212
s - t	*-161,975	44,5212

---

\* denotes a statistically significant difference.

#### The StatAdvisor

---

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 2 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95,0% confidence level. At the top of the page, 2 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Fisher's least significant difference (LSD) procedure. With this method, there is a 5,0% risk of calling each pair of means significantly different when the actual difference equals 0.

**Anexo 3****Test de hipótesis : Acidez**

	<b>Queso testigo</b>	<b>Queso con b-lactona</b>
Count	6	6
Average	1282,88	919,0
Variance	259,27	8152,91
Standard deviation	16,1019	90,2935
Minimum	1263,7	832,4
Maximum	1308,9	1008,5
Std. skewness	0,669832	0,00677364
Std. kurtosis	0,0631386	-1,64021
Sum	7697,3	5514,0

## The StatAdvisor

-----

This table shows summary statistics for the two samples of data. Other tabular options within this analysis can be used to test whether differences between the statistics from the two samples are statistically significant. Of particular interest here are the standardized skewness and standardized kurtosis, which can be used to determine whether the samples come from normal distributions. Values of these statistics outside the range of -2 to +2 indicate significant departures from normality, which would tend to invalidate the tests which compare the standard deviations. In this case, both standardized skewness values are within the range expected. Both standardized kurtosis values are within the range expected.

## Comparison of Means

-----

95,0% confidence interval for mean of Col\_3: 1282,88 +/- 16,8979

95,0% confidence interval for mean of Col\_5: 919,0 +/- 94,7574

95,0% confidence intervals for the difference between the means:

assuming equal variances: 363,883 +/- 83,4299

not assuming equal variances: 363,883 +/- 94,5482

t tests to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2

(1) Alt. hypothesis: mean1 NE mean2

assuming equal variances:  $t = 9,71815$  P-value = 0,00000206446

not assuming equal variances:  $t = 9,71815$  P-value = 0,000138691

(2) Alt. hypothesis: mean1 > mean2

assuming equal variances:  $t = 9,71815$  P-value = 0,00000103223

not assuming equal variances:  $t = 9,71815$  P-value = 0,0000693455

(3) Alt. hypothesis: mean1 < mean2

assuming equal variances:  $t = 9,71815$  P-value = 0,999999

not assuming equal variances:  $t = 9,71815$  P-value = 0,999931

The StatAdvisor

-----

This option runs a t-test to compare the means of the two samples. It also constructs confidence intervals for each mean and for the difference between the means. Of particular interest is the confidence interval for the difference between the means, which extends from 269,335 to 458,432. Since the interval does not contain

the value 0.0, there is a statistically significant difference between the means of the two samples at the 95,0% confidence level. The t-tests can also be used to arrive at the same conclusion. P-values below 0,05 indicate significant differences between the two means. NOTE: the interval used above does not assume that the variances of the two samples are equal. This was determined by running an F-test to compare the standard deviations of the two samples. You can see the results of that test by selecting Comparison of Standard Deviations from the Tabular Options menu.

## Anexo 4

### Anova 1 factor: tipo de tratamiento

Variance Check

Cochran's C test: 0,388285 P-Value = 0,613278

Bartlett's test: 1,24676 P-Value = 0,25383

Hartley's test: 7,09694

The StatAdvisor

-----

The three statistics displayed in this table test the null hypothesis that the standard deviations of Col\_1 within each of the 4 levels of Tratatam is the same. Of particular interest are the two P-values. Since the smaller of the P-values is greater than or equal to 0,05, there is not a statistically significant difference amongst the standard deviations at the 95,0% confidence level.

ANOVA Table for Col\_1 by Tratatam

#### Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	585992,0	3	195331,0	23,03	0,0000
Within groups	169647,0	20	8482,36		
Total (Corr.)	755639,0	23			

The StatAdvisor

-----

The ANOVA table decomposes the variance of Col\_1 into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 23,0278, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0,05, there is a statistically significant difference between the mean Col\_1 from one level of Tratam to another at the 95,0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.

#### Multiple Range Tests for Col\_1 by Tratam

Method: 95,0 percent LSD

Tratam	Count	Mean	Homogeneous Groups
a	6	729,717	X
d	6	903,55	X
b	6	919,0	X
c	6	1168,18	X

Contrast	Difference	+/- Limits
a - b	*-189,283	110,919
a - c	*-438,467	110,919
a - d	*-173,833	110,919
b - c	*-249,183	110,919
b - d	15,45	110,919
c - d	*264,633	110,919

\* denotes a statistically significant difference.

## The StatAdvisor

-----

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 5 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95,0% confidence level. At the top of the page, 3 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Fisher's least significant difference (LSD) procedure. With this method, there is a 5,0% risk of calling each pair of means significantly different when the actual difference equals 0.

**Anexo 5****Anova 2 vía para evaluar efecto de la cantidad de Cl<sub>2</sub> Ca agregado y la cantidad de fermento en la concentración de P**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Agreg Cl <sub>2</sub> Ca	11845,9	2	5922,97	4,60	0,0175
B:Fermento	156644,0	1	156644,0	121,72	0,0000
RESIDUAL	41182,6	32	1286,96		
TOTAL (CORRECTED)	209673,0	35			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of Col\_12 into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since 2 P-values are less than 0,05, these factors have a statistically significant effect on Col\_12 at the 95,0% confidence level.

Aplicando test de diferencias de medias

Multiple Range Tests for Col\_12 by Col\_14

Method: 95,0 percent LSD

Col_14	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
--------	-------	---------	--------------------

1	18	746,194	X
2	18	878,122	X

---

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*-131,928	24,3578

---

\* denotes a statistically significant difference.

#### The StatAdvisor

---

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 1 pair, indicating that this pair shows a statistically significant difference at the 95,0% confidence level. At the top of the page, 2 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Fisher's least significant difference (LSD) procedure. With this method, there is a 5,0% risk of calling each pair of means significantly different when the actual difference equals 0.

#### Multiple Range Tests for Col\_12 by Col\_13

---

Method: 95,0 percent LSD

Col_13	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
--------	-------	---------	--------------------

---

s	12	786,525	X
---	----	---------	---

d	12	824,092	X
t	12	825,858	X

---

Contrast	Difference	+/- Limits
d - s	*37,5667	29,8321
d - t	-1,76667	29,8321
s - t	*-39,3333	29,8321

---

\* denotes a statistically significant difference.

Lo que indica que las condiciones que favorecen obtener una mayor concentración de P en quesos, son :

La mitad de concentración de fermento y la mitad de concentración del CaCl<sub>2</sub>

The StatAdvisor

---

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 2 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95,0% confidence level. At the top of the page, 2 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Fisher's least significant difference (LSD) procedure. With this method, there is a 5,0% risk of calling each pair of means significantly different when the actual difference equals 0.

## **Anexo 6**

### **Test de hipótesis : Influencia de la Acidez en la concentración de fósforo.**

Summary Statistics

	Testigo	queso con b-lactona
Count	6	6
Average	877,017	854,183
Variance	594,022	375,226
Standard deviation	24,3726	19,3707
Minimum	848,5	827,9
Maximum	901,3	877,0
Std. skewness	-0,126828	-0,0685534
Std. kurtosis	-1,45986	-0,795832
Sum	5262,1	5125,1

No tengo diferencia estadísticamente significativa con un 95 % de confianza.

#### The StatAdvisor

This table shows summary statistics for the two samples of data. Other tabular options within this analysis can be used to test whether differences between the statistics from the two samples are statistically significant. Of particular interest here are the standardized skewness and standardized kurtosis, which can be used to determine whether the samples come from normal distributions. Values of these statistics outside the range of -2 to +2 indicate significant departures from normality, which would tend to invalidate the tests which compare the standard deviations. In this case, both standardized skewness values are within the range expected. Both standardized kurtosis values are within the range expected.

#### Comparison of Means

95,0% confidence interval for mean of Col\_10: 877,017 +/- 25,5775

95,0% confidence interval for mean of Col\_11: 854,183 +/- 20,3284

95,0% confidence intervals for the difference between the means:

assuming equal variances: 22,8333 +/- 28,3195

not assuming equal variances: 22,8333 +/- 28,5163

t tests to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2

(1) Alt. hypothesis: mean1 NE mean2

assuming equal variances: t = 1,7965 P-value = 0,102635

not assuming equal variances: t = 1,7965 P-value = 0,104168

(2) Alt. hypothesis: mean1 > mean2

assuming equal variances: t = 1,7965 P-value = 0,0513176

not assuming equal variances: t = 1,7965 P-value = 0,0520839

(3) Alt. hypothesis: mean1 < mean2

assuming equal variances: t = 1,7965 P-value = 0,948682

not assuming equal variances: t = 1,7965 P-value = 0,947916

The StatAdvisor

-----

This option runs a t-test to compare the means of the two samples. It also constructs confidence intervals for each mean and for the difference between the means. Of particular interest is the confidence interval for the difference between the means, which extends from -5,48612 to 51,1528. Since the interval contains the value 0.0, there is not a statistically significant difference between the means of the two samples at the 95,0% confidence level. The t-tests can also be used to arrive at the same conclusion. P-values below 0,05 indicate significant differences between the two means. NOTE: the interval used above assumes that the variances of the two samples are equal. This was determined by running an F-test to compare the standard deviations of the two samples. You can see the results of that test by selecting Comparison of Standard Deviations from the Tabular Options menu.



**Anexo 7****Anova 1 factor: tipo de tratamiento**

ANOVA Table for Col\_6 by Col\_5

## Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	138618,0	3	46205,8	31,00	0,0000
Within groups	29808,7	20	1490,43		
Total (Corr.)	168426,0	23			

Como vemos el tratamiento tiene un efecto significativo sobre la concentración de P en quesos para un 95 % de confianza. Aplicando test de diferencias de medias:

Multiple Range Tests for Col\_6 by Col\_5

Method: 95,0 percent LSD			
Col_5	Count	Mean	Homogeneous Groups
a	6	639,45	X
d	6	739,417	X
b	6	740,483	X
c	6	854,183	X

Contrast	Difference	+/- Limits
a - b	*-101,033	46,4947
a - c	*-214,733	46,4947
a - d	*-99,9667	46,4947
b - c	*-113,7	46,4947

b - d	1,06667	46,4947
c - d	*114,767	46,4947

---

- denotes a statistically significant difference.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1)** Química y física lactológica. Pieterwalstra Trobert Jennes Editorial John Wiler and Sons (1984)
- 2)** Archivo Latinoamericano de Nutrición. Vol. 38 (1988)
- 3)** Características de la leche. Harold Swaisgood. Química de los Alimentos, segunda edición. Owen R. Fennema. Editorial ACRIBIA S.A. (2000).
- 4)** Lactología Industrial. E. Spreer. Editorial ACRIBIA S.A. (1991)
- 5)** Introduction a la Tecnología Quesera M. Mahaut, R. Jeantet, G. Brulé. Editorial Acibia ( 2003)
- 6)** El Queso André Eck Editorial Omega (1987)
- 7)** Química Biológica. Antonio Blanco. Editorial Ateneo (2006)
- 8)** Conocimientos actuales sobre nutrición 8<sup>va</sup> edición Publicación Científica y técnica n<sup>a</sup> 592 Bowman-Russell Organización Panamericana de la Salud.(2003)
- 9)** Indicadores lácteos 2011. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
- 10)** La maduración del queso cremoso Argentino. Zalazar, C.; Meinardi, C.; Candiotti, M.; Bernal,S.; Hynes,E. Revista Argentina de Lactología 11, 59-72 (1995). Editorial: Centro de publicaciones Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe (Argentina).
- 11)** Los quesos argentinos: Queso cremoso argentino. Una revisión general sobre su producción y característica.(pp.20-49) Zalazar, C.; Meinardi,C.;Hynes,E. (1999). Editorial: Centro de publicaciones Universidad Nacional del Litoral.Santa Fe (Argentina).
- 12)** Norma Internazionale FIL-IDF 50A: 1980 “Latte e derivati del latte.Guida alle tecniche di campionamento”
- 13)** AOAC Official Method. 994.25 (1995). 16<sup>th</sup> Ed. Chapter 33.7.01. Toma de muestra de quesos.

- 14)** AOAC Official Method 944.03
- 15)** Norma Internazionale FIL-IDF 36 A, (155-159.) Latte. Determinazione del tenore in calcio. (1992).
- 16)** Handbook of electrode technology Orion Research (1982)
- 17)** AOAC Official Method 99125 (2007). Chapter 33 p. 81. Calcium, magnesium, and phosphorus in cheese. Atomic absorption Spectrophotometric and colorimetric methods.
- 18)** Análisis Instrumental Skoog-Leary. Editorial Mcgraw-Hill. (1997)
- 19)** Manual de instrucción del electrodo selectivo de calcio marca Orion modelo 9320
- 20)** Norma Internazionale FIL-IDF 33 B, 216-221. Determinazione del tenore in fosforo totale. (1982).
- 21)** Influence of milk-clotting enzyme on acidification rateo of natural whey starters. Meinardi, C.; Alonso, A. ;Hynes, E. ; Zalazar, C. International Journal of Dairy Technology, 55, (3), 139-144 (2002). Editorial : Blackwell synergy.
- 22)** Serpelloni, M.; Dusautois, C.; Buordier,J.;Lablee, J.; Mietton, B.; (1989) Iteret de la glucono-delta-lactona dans la standardisation des latís de fromagerie: optimisation du pH d'empresuragre. Revue des ENIL n° 133, 26-33.
- 23)** Jirafa, G. ; Olivar, G.; Carini, S., (1991)Impiego di glucono delta lactone nella fabbricazione di formaggi. Nota I : Crescenza. L'industria del latte 28, 57-67.
- 24)** Jirafa, G. ; Olivar, G.;(1992) Impiego di glucono delta lactone nella fabbricazione di formaggi. Nota II : mozzarella, L'industria del latte 28(1) Fasc. 4, 59-72.
- 25)** Candiotti, M.; Meinardi,C. , Zalazar,C. (2004) Effect of heat treatments higher than pasteurization on protein distribution and clotting properties of milk. Milchwissenschaft, 59, (3/4).

- 26)** Corredig, M. ; Dageish, D. (1996). The binding of  $\beta$  lactoglobulin and  $\alpha$  lactoalbumin to casein micelles in milk treated by different heating systems. *Milchwissenschaft* 51 (3) 123-127.
- 27)** Steffl,A. ;Schreiber, R. ; Hanfenmair, M.; and Kessler, H. (1999) Effect of denatured whey proteins on the rennet-induced aggregation of casein micelles. *International Dairy Journal* 9, 401-402.
- 28)** Meinardi, C.; Zalazar, C.; Hynes,E. Candiotti, M. Incremento del rendimiento del queso cremoso argentino por tratamiento de la leche a temperaturas y tiempos superiores a los de pasteurización. *Revista Argentina de Lactología* 22, 45-54 (2004). Editorial: Centro de publicaciones Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe (Argentina).
- 29).** Meinardi, C.; Hynes,E.; Candiotti, M.; Sabbag, N.; Costa, S.;Zualet,G.; Zalazar, C. Efecto de la adición de proteína de suero sobre la elaboración y calidad de queso cremoso argentino *Revista Argentina de Lactología* 16, 14-23 (1998). Editorial: Centro de publicaciones Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe (Argentina).
- 30)** Meinardi, C.; Zalazar, C.; Ceresoli, A.; Candiotti, M. Recuperación de la aptitud a la coagulación de leches tratadas para incrementar el rendimiento quesero. *Revista Argentina de Lactología* 23, 77-85 (2004/05). Editorial: Centro de publicaciones Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe (Argentina).
- 31)** Candiotti, M.; Hynes,E. ; Meinardi, C.;Sabbag, N.;Zalazar, C. Uso de fermentos seleccionados directos en la elaboración de queso cremoso argentino *Industria Lechera* 725, 18-25 (2000) Editorial: Centro de la Industria Lechera.
- 32)** Norma Internazionale FIL-IDF 152 A:. Latte. Determinazione del tenore grasso. (1997).

- 33)** Norma Internazionale FIL-IDF 20 B Latte. Determinazione del tenore in azoto. (1993)
- 34)** Norma Internazionale FIL-IDF 29 Determinazione del contenuto in caseina del Latte.. (1966)
- 35)** Norma Internazionale FIL-IDF 21 B Latte, crema e latte concentrato. Determinazione della materia secca.(1987) Metodo di riferimento.
- 36)** Hynes,E.; Meinardi, C.; Candiotti, M.; Sabbag, N.;Zualet,G. ; Zalazar, C.; Costa, S. Elaboración y maduración de queso cremoso argentino adicionado con proteínas de suero. Revista Argentina de Lactología 10, 13-23 (1998). Editorial: Centro de publicaciones Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe (Argentina).
- 37)** Zalazar, C.; Meinardi, C.; Candiotti, M. Influencia de distintos tipos de aditivos sobre el rendimiento del queso cremoso argentino. Revista Argentina de Lactología 5 (8), 65-73 (1993). Editorial: Centro de publicaciones Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe (Argentina).
- 38)** Fabricación de Queso. R Scott. Editorial Acribia (2002)
- 39)** Bradley, R. L., Arnold, E., Barbano, D. M., Semerad, R. G., Smith, D. E., & Vines, B.K. (1993), "Chemical and physical methods", In R. Marshall, *Standard methods for the -examination of Dairy Products* (433-531). Washington D.C.: American Public Health Association.