

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

DETERMINACIÓN DEL CALCIO Y FÓSFORO “SOLUBLE EN AGUA” EN QUESOS BLANDOS

Calvete, Ornella – LU: 1016987

Fretes, Federico German – LU: 1036047

Ingeniería en Alimentos

Tutor:

Rosito, Pablo, UADE

Colaboradores:

Bruno, Viviana, Chr. Hansen

Guzman, Leticia, Chr. Hansen

Nugnes, Rodrigo, Chr. Hansen

Lugar de Trabajo: Laboratorios de la Universidad Argentina de la Empresa ‘UADE LABS’

Junio 03, 2019



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

AGRADECIMIENTOS

Resulta difícil el momento de nombrar a todas las personas a las que estamos agradecidos por la ayuda y el apoyo sustancial que nos dieron no solo para terminar este Proyecto Final de Ingeniería, sino por todo lo que nos brindaron a lo largo de los últimos años para que hoy en día estemos en este lugar. Resulta difícil por que son muchos, son muchos ya que sentimos cariño por los que ya estaban en nuestras vidas y nos logramos encariñar también con los que aparecieron como consecuencia de estas decisiones tomadas en los últimos años que hoy en día nos acercaron a la carrera de Ingeniería en Alimentos.

Estas personas nombradas no están dispuestas en un orden jerárquico ni nada similar, pero por orden cronológico podríamos decir que empezamos por nombrar a nuestras familias, padres y hermanos, que nos apoyaron toda nuestra carrera con nuestros altibajos y nos abrieron las puertas con la posibilidad de estudiar en una hermosa universidad como UADE, siempre con una palabra de cariño y aliento cuando nos iba mal en un examen o necesitábamos un mano.

Así mismo agradecemos a todo el equipo de profesores de UADE que de distintas facultades nos han instruido y brindado sus conocimientos y experiencias para formarnos mejor como profesionales, y como personas. Con agradecida mención a la Srta. Adriana Pérez, profesora de la cátedra de estadística, que nos ayudó con estos análisis.

A nuestros compañeros de curso, que hicieron nuestras clases más placenteras y divertidas, siempre con algún mate o ayuda para estudiar en grupo y compartir lo sabido.

Al equipo de Chr. Hansen, que nos brindó el tema del proyecto, asesorándonos y brindándonos todos los insumos requeridos para esta investigación.

A nuestro tutor Pablo Rosito por estar siempre con nosotros encarando las problemáticas del día a día y nutriéndonos con su saber, ayudándonos en los momentos de incertidumbre.

Al equipo de UADE Labs que siempre nos abrió las puertas con una sonrisa cuando necesitamos trabajar y abasteciéndonos de insumos e instrumentos.



PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS: DETERMINACIÓN
DEL CALCIO Y FÓSFORO “SOLUBLE EN AGUA” EN QUESOS BLANDOS

Calvete, Ornella y Fretes, Federico German

A nuestro director de carrera, Martín Piña, y a todo el equipo administrativo de FAIN
por permitir que esta hermosa carrera exista y progrese continuamente.

Eternamente agradecidos,
Ornella Calvete y Federico G. Fretes

RESUMEN

El queso está compuesto por ciertos productos sólidos de la leche, tales como: proteínas, grasa, minerales, azúcares, etc. Para retener estos compuestos de manera concentrada la leche es coagulada, ya sea por medio de ácido láctico producido por bacterias o por la adición de cuajo proveniente del cuarto estómago de terneros que contienen diversas sustancias naturales (enzimas) que provocan la coagulación de la leche.

Existen muchos tipos de quesos asociados a distintos procesos de elaboración. Normalmente se identifican las siguientes clases:

- Quesos frescos no madurados, como el queso blanco.
- Queso de pasta blanda, como el Cuartirolo, Port Salut o cremoso.
- Queso de pasta semidura como el queso criollo, Mar del Plata o Fontina.
- Queso de pasta dura como el Reggianito o Sardo.
- Quesos procesados o fundidos.

En este trabajo nos enfocaremos en los quesos de pasta blanda ya que son los de mayor consumo en Argentina.

El calcio y el fósforo de los quesos se encuentran en mayor medida en agregados denominados fosfato cálcico coloidal (CCP): $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaH citrato}$, $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$, y $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, el cual es ácido y amorfo (22); Y también se encuentran en menor medida formando cristales insolubles de lactato de calcio ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{CaO}_6$), fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) y fosfatos orgánicos en cadenas residuales de fosfoserina, que forman enlaces covalentes entre las cadenas peptídicas de las micelas de caseína.

El CCP es de gran importancia ya que actúa como agente cementante entre las caseínas para que puedan formar micelas hidratadas y suspendidas en la leche. Estas micelas son las que precipitan para formar el queso, generando un gel proteico que encierra al suero y a los glóbulos grasos; esta nueva agregación de las micelas de caseína genera nuevas uniones entre ellas, todas dependientes del calcio presente en la matriz y del cloruro de calcio (CaCl_2)

añadido durante la elaboración que forma nuevas uniones fosfocálcicas, de ahí la importancia de éste ion en la elaboración de quesos.

El CCP se disuelve a bajo pH, incrementándose por debajo de pH 5.6 y quedando completamente disuelto a pH 5.0, esto hace que la concentración de calcio en el queso sea completamente dependiente del pH al momento del desuerado, si el pH en el desuerado es muy ácido la concentración de calcio en el queso será muy baja y las micelas de caseína tendrán uniones pobres. Una vez desuerado, en la matriz del queso también hay una relación de calcio insoluble unido a las caseínas y calcio soluble suspendido en la fase acuosa del queso, esta relación puede variar a favor del calcio soluble a medida que el pH del queso disminuye por acción bacteriana durante la maduración (23). La fracción de importancia para las características de la textura del queso es la del calcio insoluble, ya que es el responsable de mantener unida a la red tridimensional de caseínas, ésta se puede cuantificar midiendo la capacidad buffer del queso ya que es directamente proporcional a la cantidad de calcio unido a las micelas; De igual manera, partiendo de una cantidad conocida de calcio total, se puede calcular por diferencia midiendo el calcio soluble.

Nuestro trabajo consiste en seleccionar el método más favorable para la extracción de la fase acuosa de quesos blandos, provistos por la planta piloto de Chr. Hansen, determinación en dicha fase del Calcio y Fósforo solubles y puesta a punto del método.

ABSTRACT

Cheese is made up of certain solid milk products, such as: proteins, fat, minerals, sugars, etc. To concentrate these parts, milk is coagulated either by lactic acid produced by bacteria or by the addition of rennet from the fourth stomach of calves that contain various natural substances (enzymes) that cause coagulation of the milk.

There are many types of cheeses associated with different manufacturing processes. The following classes are usually identified:

- Fresh unripened cheeses, like white cheese.
- Soft cheeses, such as Cuartirolo, Portsalut or creamy.
- Semi-hard cheeses, such as Creole cheese, Mar del Plata or Fontina.
- Hard cheeses like Reggianito or Sardo.
- Processed or melted cheeses.

In this work we will focus on soft cheeses because these are the most consumed in Argentina.

Calcium and phosphorus in cheeses are found mostly in aggregates called colloidal calcium phosphate (CCP): $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaH citrate}$, $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$, and $\text{CaHP0}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, which is acid and amorphous (22); A small quantity is also found as part of insoluble crystals of calcium lactate ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{CaO}_6$), calcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) and organic phosphates in residual phosphoserine chains, which forms covalent bonds between the peptide chains of the casein micelles .

CCP is very important because it acts as a cementing agent between the caseins, so that they can form micelles that are hydrated and suspended in the milk. These micelles are the ones that precipitate to form the cheese, generating a protein gel that encloses the serum and the fat globules; This new aggregation of the casein micelles generates new bonds between them, all dependent on the calcium present in the matrix and the calcium chloride (CaCl_2) added during the elaboration that will form new phosphocalcic bonds, therefore the importance of this ion in the elaboration of cheeses.

The CCP dissolves at low pH, increasing below pH 5.6 and being completely dissolved at pH 5.0, this makes the concentration of calcium in the cheese completely dependent on the pH at the time of draining, if the pH in the drained is very acid the concentration of calcium in the cheese will be very low and the casein micelles will have poor bonds. Once drained, in the cheese matrix there is also a relation between insoluble calcium bound to the caseins and soluble calcium suspended in the aqueous phase of the cheese, this relation can be changing in favor of the soluble calcium as the pH of the cheese decreases by bacterial action during maturation (23). The important fraction for the textures characteristics of the cheese is the insoluble calcium, since it is the one that holds together the three-dimensional network of caseins, this can be quantified by measuring the buffer capacity of the cheese since it is directly proportional to the amount of calcium bound to micelles; But in the same way, knowing previously the amount of total calcium can be calculated by difference by measuring the soluble calcium.

Our work consists of selecting the most favorable method for the extraction of the aqueous phase of soft cheeses, provided by the pilot plant of Chr. Hansen, determination in this phase of soluble Calcium and Phosphorus and validation of the method.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	5
4- INTRODUCCIÓN	9
4.1- Relevancia del tema	9
4.2- Descripción de la estructura del informe	10
4.3- Marco Teórico	10
4.3.1- Leche	10
4.3.2- Proteínas de la leche	13
4.3.2.1- Composición de la Caseína	14
4.3.2.2- Mecanismo de coagulación de la caseína por vía enzimática	17
4.3.2.3- Factores que afectan a la coagulación enzimática de la leche.	24
4.3.3- Requerimiento de calcio y fósforo en el organismo	30
4.3.4- Relación calcio fósforo en los alimentos	32
4.3.5- Datos estadísticos sobre producción y consumo de lácteos en Argentina	33
4.3.5.1- Producción láctea argentina	33
4.3.5.2- Producción nacional de quesos	38
4.3.5.3- Consumo nacional de quesos	40
4.3.6- Ventajas del queso sobre la leche	42
4.3.7- Quesos argentinos de pasta blanda	42
4.3.8- Elaboración de quesos. Características generales	45
4.3.9- Queso cremoso. Tecnología de elaboración	46
4.4- Objetivos	50
4.4.1- Objetivo General	50
4.4.2- Objetivo Específico	50
5- ANTECEDENTES	51
5.1- Antecedentes previos generales	51
6 - METODOLOGÍA DE DESARROLLO	52
6.1 - Procedencia de las muestras	52
6.2 - Tratamiento de las muestras	52
6.3 - Toma de muestra	53
6.4 - Determinación de humedad total	53
6.5 - Tratamiento de la muestra para la determinación de calcio y fósforo totales	54

6.6 - Determinación de Ca total	56
6.7 - Determinación de P total	57
6.8 - Tratamiento de la muestra para la determinación de calcio y fósforo solubles (extracción de la fase acuosa).	58
6.9 - Determinación de Ca soluble	61
6.10 - Determinación de P soluble	61
7 - DISCUSIÓN	62
7.1 - Resultados	62
7.1.1 - Resultados de humedad total	62
7.1.2 - Resultados de calcio total	63
7.1.3 - Resultados de fósforo total	65
7.1.4 - Resultados de las extracciones de humedad	66
7.1.5 - Resultados de calcio soluble	68
7.1.6 - Resultados de fósforo soluble	70
7.2 - Limitaciones y dificultades	71
7.3 - Conclusiones	75
7.3.1 - Conclusiones del método utilizado	75
7.3.2 - Conclusiones sobre las muestras utilizadas	75
8 - BIBLIOGRAFÍA	77
9 - ANEXOS	82
Anexo A:	82
Anexo B:	86
Anexo C:	92
Anexo D:	93
Anexo E:	94
Anexo F:	96
Anexo G:	98
Anexo H:	101

4- INTRODUCCIÓN

4.1- Relevancia del tema

La leche es un alimento de alto valor biológico. Su riqueza en proteínas, vitaminas y minerales, la 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 fósforo absorbido en el cuerpo forman parte del esqueleto, además de participar de otras funciones importantes del organismo. La fuente fundamental de estos iones en el organismo es la dieta, de allí la importancia de los productos lácteos.

El queso es la forma de conservación más importante de las proteínas y los minerales de la leche, concentrando todos los sólidos (menos los del lactosuero que se eliminan en la prensada de la cuajada) en una relación aproximada de 10:1 (22). Por ello siempre ha sido motivo de estudio la elaboración del mismo y la mejor conservación de estos nutrientes.

Conocer con exactitud las cantidades de calcio y fósforo en el queso es fundamental desde el punto de vista nutricional para saber la proporción Ca/P ya que determinará la absorción del calcio en los intestinos, de mayor importancia para el sistema óseo y desde el punto de vista tecnológico para poder cuantificar la relación de calcio soluble e insoluble y así poder hacer modificaciones en la textura del queso o determinar problemas técnicos. Por ejemplo un déficit de iones calcio en la matriz se puede corregir con el agregado de CaCl_2 (cloruro de calcio) para reponer el equilibrio salino en la leche luego del tratamiento térmico de la leche.

4.2- Descripción de la estructura del informe

El informe se divide en bloques generales para una lectura y comprensión más llevadera de la investigación:

1. Recopilación bibliográfica: Marco Teórico.
2. Definición de los objetivos y el método a implementar (ensayos).
3. Resultados de dichos ensayos.
4. Discusión de las dificultades encontradas durante la investigación y las soluciones aplicadas para estas.
5. Conclusiones finales, sobre el método aplicado y sobre las diferentes muestras de quesos que nos brindó Chr. Hansen para trabajar.
6. Bibliografía.
7. Anexos.

4.3- Marco Teórico

4.3.1- Leche

La definición de leche por defecto según el Código Alimentario Argentino dice lo siguiente *"Con la denominación de Leche sin calificativo alguno, se entiende el producto obtenido por el ordeño total e ininterrumpido, en condiciones de higiene, de la vaca lechera en buen estado de salud y alimentación, proveniente de tambos inscriptos y habilitados por la Autoridad Sanitaria Bromatológica Jurisdiccional y sin aditivos de ninguna especie. La leche proveniente de otros animales, deberá denominarse con el nombre de la especie productora"*. (Ley 18284 ‘Código Alimentario Argentino’, Capítulo VIII, Artículo 554 - (Res 22, 30.01.95), actualizado al 03/2019).(32).

De la misma ley se detallan los siguientes requisitos, “*La leche destinada a ser consumida como tal o la destinada a la elaboración de leches y productos lácteos, deberá presentar las siguientes características físicas y químicas: (ver Tabla I)*”

TABLA I: Características fisicoquímicas de la Leche

Requisito	Valores aceptados	Método de análisis
Densidad a 15°C	1,028 a 1,034	AOAC 18th Ed. 925.22
Materia grasa (g/100cm ³)	Mín. 3,0	ISO 1211/IDF 001:2010
Extracto Seco No Graso (**) (g/100g)	Mín. 8,2	ISO 6731/IDF 021:2010
Acidez (g. Ácido láctico/100cm ³)	0,14 a 0,18	AOAC 18th Ed. 947.05
Descenso crioscópico	Máx. -0,512 °C (equivalente a -0,530°H)	ISO 5764 – IDF 108:2009
Proteínas Totales (N x 6,38) (**) (g/ 100g)	Mín. 2,9	ISO 8968 – 2 – IDF 020-2:2001

(**) *Podrá ser expresado en su equivalente en g/100cm³ tomando para la conversión el valor de densidad (a 15°C) correspondiente.*” (Ley 18284 ‘Código Alimentario Argentino’, Capítulo VIII, Artículo 555 - (Resolución Conjunta SPReI N°252/2014 y SAGyP N° 218/2014), actualizado al 03/2019).(31).(32).

La leche tiene altas cualidades nutritivas, 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. (16)

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 (aproximadamente 1 g Ca/1 L leche) y tiene buena biodisponibilidad (del 25 al 50 %) atribuible a la proporción ideal en la que se encuentra con el fósforo ($\text{Ca} / \text{P} = 1,4$) y a que la absorción intestinal se ve favorecida por la presencia de vitamina D, proteínas y lactosa. (18).

Actualmente se cree que las reservas de calcio en el organismo se forman fundamentalmente en la adolescencia y en la juventud, y que cuanto 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.

Un porcentaje elevado de las poblaciones africanas y asiáticas producen menos β -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.(16).

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.

4.3.2- Proteínas de la leche

Las proteínas características de la leche están compuestas por las caseínas ($\alpha, \beta, \gamma, \kappa$) y las proteínas del suero (Δ -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, albúmina, inmunoglobulinas, lactoferrina y otras proteínas menores del lactosuero). (29). Estas proteínas se diferencian (ver Tabla II) por su origen y características químicas. Desde el punto de vista tecnológico las diferencias más destacables son: (13).

- Su distinta solubilidad a pH 4,6: las proteínas del suero son solubles y las caseínas no (ese pH es el punto isoeléctrico de estas últimas). Gracias a esta última característica se fabrica, por ejemplo yogur, y pueden separarse fácilmente ambas especies proteicas.
- La capacidad de algunas proteasas para coagular las caseínas y formar un gel (base de la industria quesera) mientras que las proteínas del suero no son sensibles a esas enzimas.
- La termorresistencia de las caseínas, que permite la esterilización de la leche sin que gelifique. Las proteínas del suero se desnaturalizan por la acción del calor.
- Las caseínas forman partículas coloidales (las micelas), mientras que las proteínas del suero se encuentran disueltas en la fase acuosa de la leche.

TABLA II: Diferencias entre caseínas y proteínas del lactosuero

Diferencias más importantes entre caseínas y proteínas del suero.		
	Caseínas	Proteínas del suero
Solubilidad a pH 4,6	No	Si
Coagulación por quimosina	Si	No
Termorresistencia	Si	No
Fósforo	Si	No
Azufre	0,8% (fundamentalmente Met)	1,7% (Met y Cis)
Origen	Glándula mamaria	Glándula mamaria y plasma
Estado	Coloidal	En disolución

Las caseínas se encuentran formando un sistema coloidal, encontrándose estables y homogéneamente dispersas en la leche. Estas se han de aglomerar o flocular en el proceso de coagulación, formando un gel. (14).

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. (18).

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 a su alto valor biológico. 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.(9).

4.3.2.1- Composición de la Caseína

Las caseínas se encuentran en forma de dispersión coloidal formando partículas de un tamaño variable. Estas partículas que dispersan la luz, y por lo tanto confieren a la leche su característico color blanco, reciben el nombre de micelas. En torno al 95 % de las caseínas forman partículas coloidales, quedando el resto molecularmente dispersas en el seno de la leche. La micela no está formada sólo por caseínas, sino que en términos de extracto seco, aproximadamente el 7 % son componentes de bajo peso molecular. Estos reciben el nombre de fosfato cálcico coloidal (generalmente a esta fracción se la conoce con las siglas CCP, iniciales de la expresión en inglés “colloidal calcium phosphate”) que permiten las uniones entre las caseínas.(13).

A pesar de su nombre, el CCP está compuesto, además de fósforo y calcio, por citrato, magnesio y otros minerales. Al microscopio electrónico las micelas se observan como partículas esféricas con un diámetro entre unos 40 y más de 300 nanómetros. El tamaño y el número de micelas están inversamente relacionados; es decir, son más numerosas cuanto más

pequeño es su tamaño. La micela es una partícula muy hidratada, se calcula que por cada gramo de materia seca pueden haber unos 3 grs. de agua.

La composición media de la micela de caseína, se ve en la tabla III.(11).

TABLA III: Composición media de la micela de caseína en g. 100g-1

Caseínas		Componentes salinos	
αS_1	33	Calcio	2,9
αS_2	11	Magnesio	0,2
β	33	Fosfato inorgánico	4,3
κ	11	citrato	0,5
γ	4		
Total caseínas	92	Total comp salinos	8,0

La micela (Fig. 1) 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 residuos fosfóricos.

La agregación entre las submicelas (Fig. 2) 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 debido a su alto contenido en ácido aspártico y glutámico. 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 cargas eléctricas negativas del mismo signo, lo que hace que las micelas de caseínas se repelan entre sí generando un movimiento browniano, quedando así impedida la precipitación de estas.(14).(8).

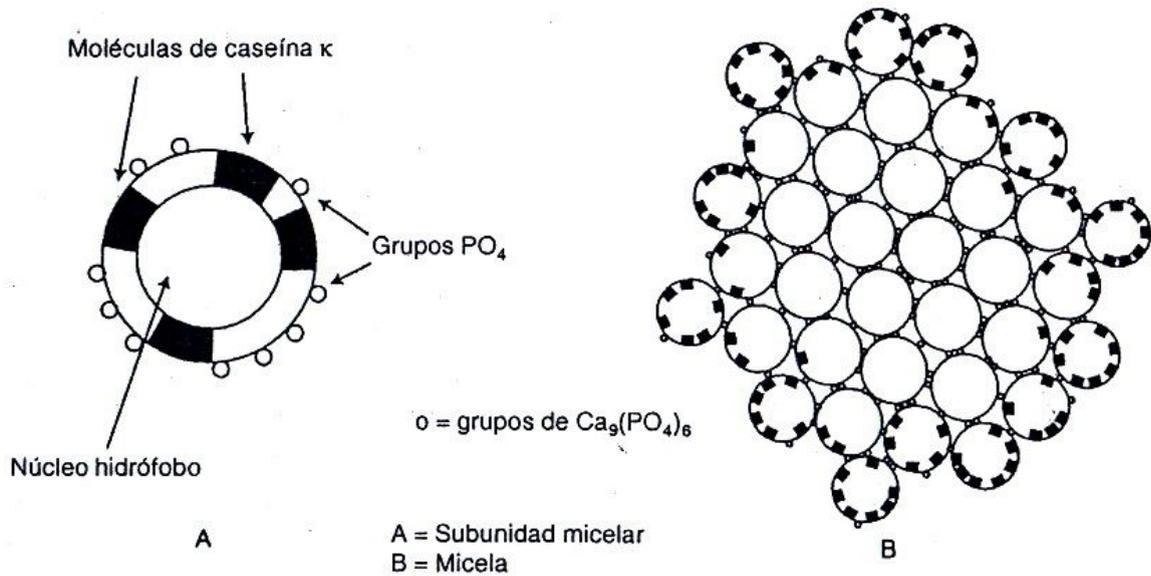


Figura 1: Estructura de la submicela y micela de caseína

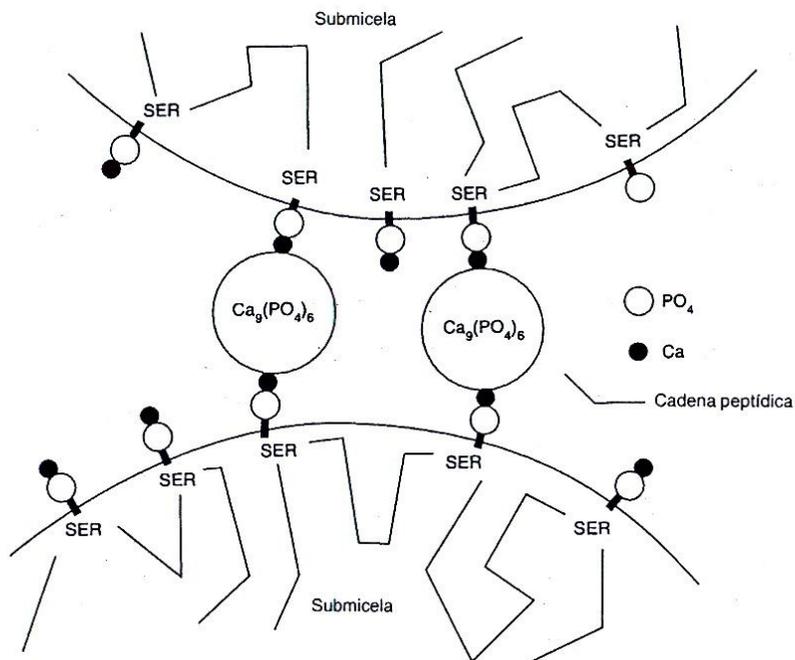


Figura 2: Esquema de la estructura tipo puente de dos submicelas por medio del fosfato de calcio.

Alrededor de mil submicelas, en promedio, se enlazan por iones calcio para formar una micela (Fig. 3).(13).

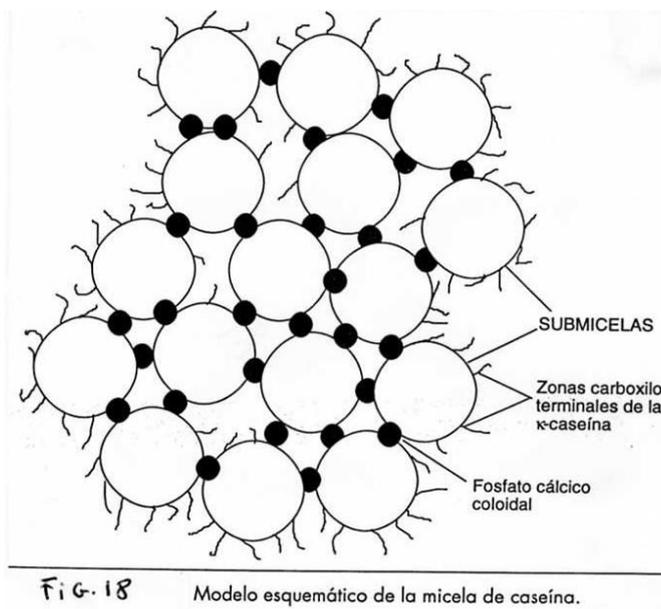


Figura 3: Micela de Caseína.

4.3.2.2- 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), que pueden ser de origen animal, vegetal o microbiano (hongos unicelulares), cada uno de éstos tiene su temperatura y pH óptimos de trabajo.

El más utilizado comercialmente es el cuajo animal, cuyo principio activo es una enzima denominada *quimosina*. De esta manera la coagulación tiene lugar muy poco tiempo después de la adición del cuajo a la leche.

El cuajo se extrae de los estómagos de los terneros jóvenes y se comercializa en forma de solución líquida con una fuerza usual de 1:10.000 a 1:15.000, lo que significa que una parte de cuajo puede coagular 10.000-15.000 partes de leche en 40 min a 35°C. Se puede

utilizar también cuajo bovino y porcino, frecuentemente en combinación con cuajo de ternero (50:50, 30:70, etc.).

Los coagulantes vegetales y de origen microbiano funcionan muy bien como sustitutos del cuajo, con la desventaja que a veces los coagulantes vegetales desarrollan sabores amargos durante la maduración del queso.(17).

De acuerdo al Codex Alimentarius de la FAO/OMS (2008), *el queso es el producto sólido o semisólido, madurado o fresco, en el que el valor de la relación suero proteínas/caseína no supera al de la leche, y que es obtenido por coagulación (total o parcial) de la leche por medio de la acción del cuajo o de otros agentes coagulantes adecuados, con un escurrido parcial del lactosuero* (Scott et al., 1998).(15).

Cuando se fabrica queso se distinguen dos fases en la coagulación de la caseína por vía enzimática:

1- Fase primaria o enzimática

2- Fase secundaria o no enzimática.

1- Fase primaria o enzimática: En esta etapa se produce la hidrólisis de la k-caseína por ataque enzimático del agente coagulante (generalmente quimosina), en el ataque se pierde el grupo hidrofílico (glicomacropéptido), especialmente en el enlace Fen₁₀₅-Met₁₀₆ (Fig. 4).

La primera región de la k-caseína (k-CN f1-105) se conoce como para-k-caseína y queda unida a la micela, mientras que la segunda (k-CN f106-169) se conoce como glicomacropéptido (GMP) y se pierde en el medio acuoso. Al existir distintas k-caseínas con diferentes contenidos de azúcares en sus cadenas, se conocen hasta 10 glicomacropéptidos distintos que se producen en la fase enzimática de la coagulación.

Estudios demostraron que no es el enlace Fen₁₀₅-Met₁₀₆ en sí lo que permite el anclaje de la quimosina, sino las secuencias de aminoácidos que están a su alrededor, especialmente los residuos Ser₁₀₄, Leu₁₀₃, Ile₁₀₈, His₉₈, His₁₀₀, His₁₀₂ y Lis₁₁₁; Se sugiere que la secuencia Leu₁₀₃

a Ile108 existe como una estructura proteica de hoja- β extendida que se ajusta al sitio activo de las proteinasas ácidas.(7).



Figura 4: Secuencia de aminoácidos de la k-caseína, mostrando el sitio principal de corte de la quimosina (\downarrow), los oligosacáridos se unen a algunos o todos los residuos de treonina (*Thr*) que se muestran en letra cursiva.

Factores que afectan la fase primaria o enzimática:

- **pH:** El pH óptimo para la quimosina en la primera fase de la coagulación de la leche es aproximadamente 6,0 de 4-30°C.
- **Fuerza iónica:** El agregado de cloruro de sodio (NaCl) en concentraciones de hasta 3 mM reduce el tiempo de coagulación debido a que remarca las interacciones electrostáticas entre quimosina-sustrato fomentando las uniones. Aunque es sabido que concentraciones mayores a ésta producen un efecto inhibitorio de la reacciones

enzimáticas, y desplazan a los cationes calcio (Ca^{2+}) de gran importancia en la segunda fase de la coagulación.

- **Temperatura:** La temperatura óptima de la leche pH 6,6 para ser coagulada con quimosina es 45°C. Sin embargo no se llega a esta temperatura de trabajo debido a que en la elaboración de quesos se usan cultivos bacterianos que tienen temperaturas menores de crecimiento.
- **Tratamientos térmicos de la leche:** Los tratamientos térmicos a más de 65°C afectan adversamente a la coagulación de la leche, debido a que se desnaturalizan las proteínas del suero y forman puentes disulfuro con la k-caseína, interfiriendo en la acción proteolítica.
- **Agente coagulante:** La quimosina es la proteasa más utilizada por sus características ya mencionadas, pero además existen otras enzimas coagulantes con una actividad proteolítica superior que no se utilizan ya que coagulan la leche tan rápido que reducen el rendimiento quesero, y también pueden conducir a defectos en la textura y sabor (especialmente amargor) en el queso.

2- Fase secundaria o no enzimática: En la primera fase las micelas se desestabilizan y flocculan (Fig. 5), para unirse entre ellas en la segunda fase de la coagulación.

Cuando aproximadamente el 85% de las k-caseínas son hidrolizadas, las micelas se desestabilizan y comienzan a chocar entre ellas generando nuevas uniones de naturaleza fosfocálcicas. Esta nueva red tridimensional se denomina coágulo, gel o cuajada cuando proviene de la leche (paracaseinato dicálcico), y viene acompañada por un gran incremento de la viscosidad y de la resistencia elástica al corte (G') que es la medida de la firmeza del gel.

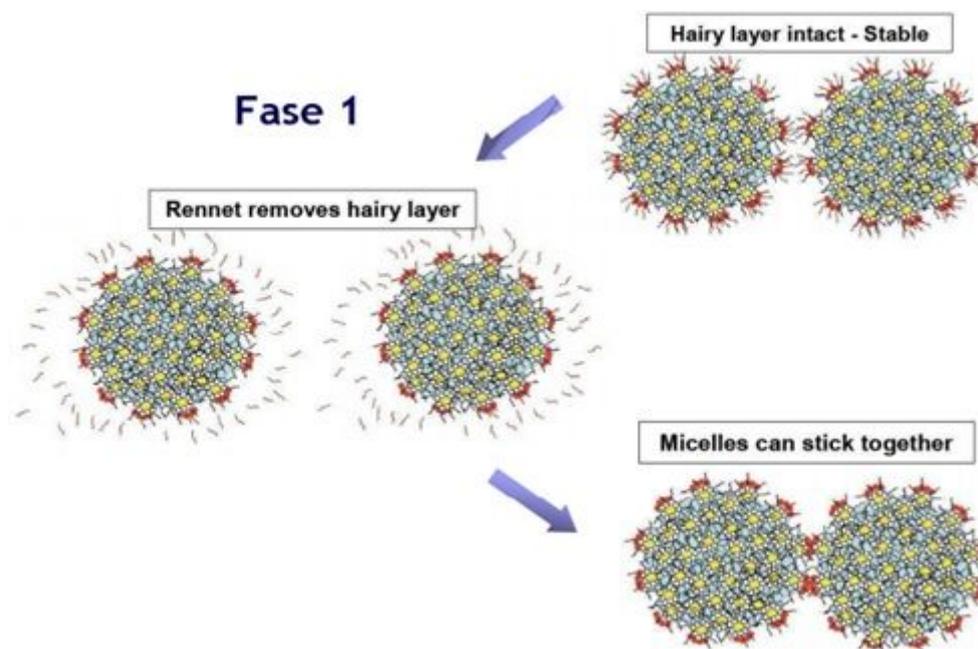


Figura 5: Desestabilización enzimática de las micelas de caseína.

Las mediciones durante el tiempo total de coagulación (Fig. 6) indican que en el primer 60% de éste (correspondiente a la fase enzimática), la viscosidad se mantiene constante y hasta decrece ligeramente. En esta fase (también llamada de latencia) se comienzan a hidrolizar las k-caseínas y se cree que disminuye la viscosidad debido a la pérdida de volumen de las micelas al ser parcialmente hidrolizadas en su superficie. Al finalizar la fase de latencia aproximadamente el 85% de las k-caseínas fueron hidrolizadas y comienza la fase secundaria o no enzimática donde las micelas comienzan a flocular y agregarse en cadenas cortas denominadas ‘puentes’ de aproximadamente 655 nm de largo y 40 nm de ancho, durante ésta la viscosidad aumenta exponencialmente. Al 100% del tiempo total de coagulación estos puentes comienzan a unirse entre si y forman la cuajada (Fig. 7). Se cree que las micelas se unen por las colisiones al azar, a una velocidad límite determinada por el modelo descrito por von Smoluchowski para agregación de coloides hidrofóbicos.

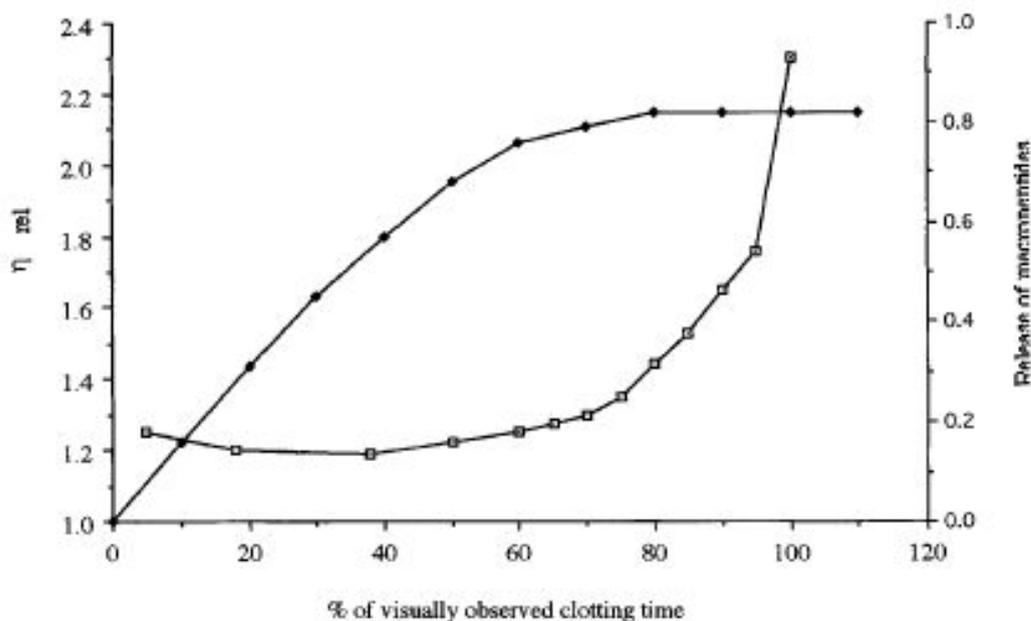


Figura 6: Cambios medidos durante el tiempo total de coagulación; liberación de macropéptidos (◆) y viscosidad relativa (◻).

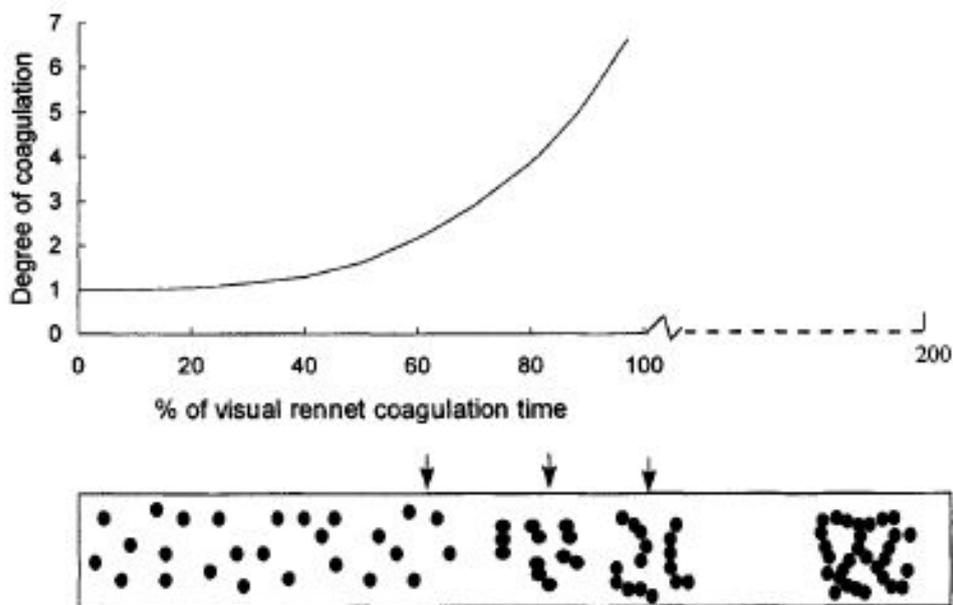


Figura 7: Representación del proceso de agregación micelar durante el tiempo total de coagulación, se puede observar cómo al 100% las micelas se agregan en puentes, y pasado este tiempo se obtiene un gel apto para el corte.

Pasado el tiempo total de coagulación la cuajada experimenta profundas reorganizaciones, formando una fase continua que encierra a los glóbulos grasos y al suero en sus poros. Con el tiempo, las uniones fosfocálcicas y posiblemente los puentes disulfuro entre las micelas, generan que el gel tome consistencia y se contraiga (sinéresis) eliminando el suero encerrado en su interior (Fig. 8).(7).

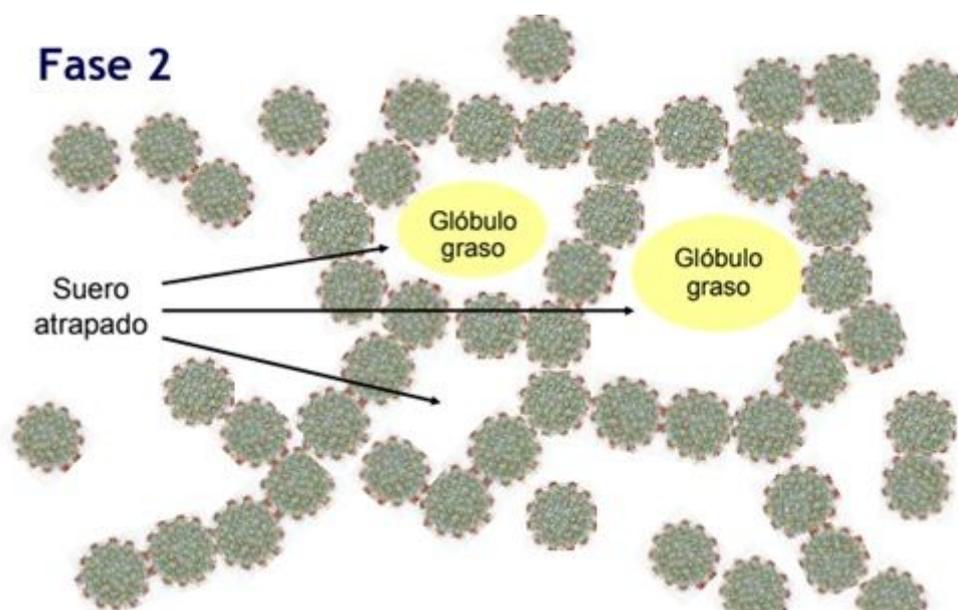


Figura 8: Esquema de la matriz de la cuajada (gel).

Factores que afectan la fase secundaria o no enzimática:

- **Temperatura:** La coagulación de las micelas es muy dependiente de la temperatura y en el caso de la leche bovina, no coagulará a menos de 18°C (a menos de que se aumente la concentración de iones Ca^{2+}). Esta dependencia de altas temperatura sugiere de que las interacciones hidrofóbicas son importantes en la coagulación.
- **Presencia de Ca^{2+} :** La coagulación depende de una concentración crítica de Ca^{2+} , que actúa de unión entre las micelas de caseína ya sea por enlace con las fosfoserinas micelares o por la neutralización de cargas negativas de los grupos fosfato. El CCP que

también es esencial para la unión entre las caseínas puede ser reemplazado con el aumento de Ca^{2+} .

- **pH:** La reducción a un pH entre 6,6-6,0 aumenta la velocidad de las reacciones enzimáticas y de gelificación, disminuye el tiempo de esta última (pues requiere menor cantidad necesaria de k-caseínas hidrolizadas para comenzar a gelificar: ~97% a ~80% de las k-caseínas totales). También aumenta la firmeza del gel por sinéresis por aumento de la sinéresis a medida que desciende el pH.
- **Tratamientos térmicos de la leche:** Los tratamientos térmicos altos ($>65^{\circ}\text{C}$) desnaturalizan las proteínas del suero, en especial a la β -lactoglobulina que forma puentes disulfuro con la k-caseína e interfiere negativamente en la formación del gel, interrumpiendo las uniones entre caseínas. A tratamientos térmicos severos ($>90^{\circ}\text{C}$ por 10 min) la leche es incapaz de coagular por acción enzimática.

4.3.2.3- Factores que afectan a la coagulación enzimática de la leche.

Ya se detalló en el punto anterior que la coagulación enzimática de la leche es un proceso que consta de dos pasos, pero los factores globales (internos y externos a la leche) suelen afectar directamente al tiempo de coagulación y a la firmeza del coágulo final. En general hay una relación inversa entre estos, lo que significa que si un factor reduce el tiempo de coagulación incrementa la firmeza del coágulo y viceversa.(7).

Estos factores son:

1. **Nivel proteico:** La leche necesita un nivel mínimo de proteínas del 2,5-3,0% (m/m) para poder gelificar. Al superar el 3,0%, el tiempo de coagulación disminuye notoriamente y aumenta la firmeza del coágulo formado, hasta un punto donde está limitado por la cantidad de coagulante inicial. Si la proporción de proteínas y coagulante se aumentan simultáneamente, estos efectos también aumentan a la par.

Una técnica que se basa en este fenómeno, es concentrar la leche por ultrafiltración para aumentar su contenido proteico y así usar menos cantidad de coagulante para gelificar. El único defecto de esto es que la maduración se demora ya que depende de la cantidad de enzimas proteolíticas en la misma.

- 2. Nivel graso:** Aumentar el contenido graso en un rango del 0,1-10% mejora las propiedades de coagulación disminuyendo el tiempo de ésta y aumenta la firmeza del coágulo. Aunque los efectos positivos son mucho menores que los obtenidos al aumentar el nivel proteico, si se aumenta notoriamente el nivel graso disminuirá el proteico y los efectos serán contraproducentes.

Industrialmente no se suele estandarizar el nivel proteico de la leche por ultrafiltración, por lo que no se suele agregar más de un 4% de grasa a la leche ya que cantidades mayores a esta diluyen el nivel proteico y son desfavorables para la coagulación.

- 3. Homogeneización de la leche:** Aunque la homogeneización de la materia grasa se utiliza para fomentar la lipólisis durante la maduración de ciertos quesos, se demostró que disminuye ligeramente el tiempo de coagulación y aumenta también ligeramente la firmeza del coágulo.

Sin embargo, la humedad superior de los quesos elaborados con leche homogeneizada puede alterar el nivel de agregación de las caseínas en las últimas etapas de la coagulación.

- 4. Temperatura de pasteurización:** Los tratamientos térmicos bajos de hasta 65°C, son beneficiosos para la coagulación porque disminuyen el pH y precipitan el fosfato cálcico del medio. Estos cambios también se producen a temperaturas superiores a los 65°C pero son contrarrestados por los efectos de desnaturalización e interacción de las proteínas del suero con las k-caseínas, y por la deposición del fosfato cálcico insoluble en las superficies de intercambio de temperatura. Ésta conlleva a la reducción de CCP total, el cual es de suma importancia para la unión de las paracaseínas durante la formación del gel.

La desnaturalización de proteínas del suero afecta en mayor medida a la segunda fase de la coagulación enzimática, tanto que una leche tratada a 80°C por 15 s (aprox. 15% proteínas del suero desnaturalizadas) ya es inadecuada para la industria quesera, y una leche tratada a más de 90°C por 10min (80-90% de desnaturalización) es incapaz de coagular.

Si la leche calentada se enfría, el tiempo de coagulación aumenta aún más por un fenómeno denominado histéresis del cuajo (Fig 9). En la práctica, la leche debe ser pasteurizada inmediatamente antes de la elaboración del queso y no debe almacenarse en frío antes de usarla.

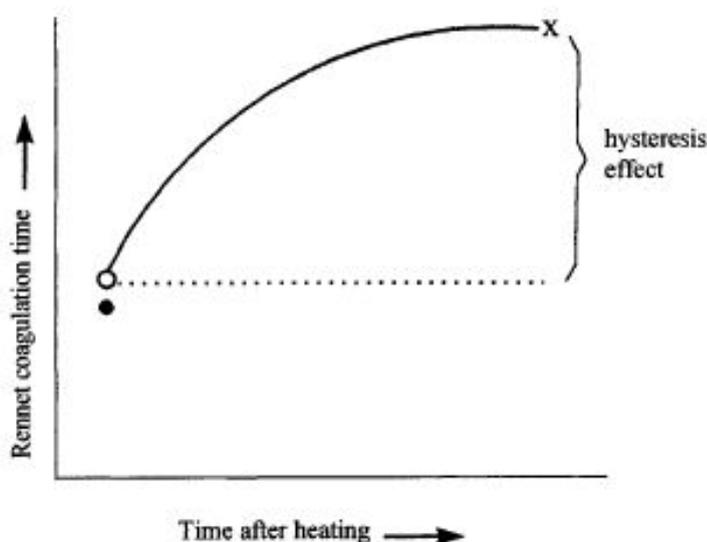


Figura 9: Efecto de la histéresis en el tiempo de coagulación de la leche (RCT, *Rennet coagulation time*); RCT para leche cruda (●), RCT para leche inmediatamente después de pasteurización (○), y para leche 6 hr después de pasteurización (X).

5. Enfriamiento y almacenamiento en frío: La leche cruda o pasteurizada al enfriarse y almacenarse pierde cualidades para coagular ya que:

- Se disuelve el fosfato cálcico coloidal (CCP) de las micelas, aumentando el pH.
- Algunas proteínas de las micelas se disocian, en especial las β -caseínas.
- Crecen organismos psicrótrofos.

Estos cambios pueden revertirse por pasteurización HTST o por calentamiento de la leche a bajas temperaturas, como a 31°C, por un mayor período

- 6. Temperatura de coagulación:** Este factor es muy importante en la fase secundaria (no enzimática) de la coagulación, ya que ésta no ocurre a temperaturas menores a 18°C. Pasada esta temperatura, el tiempo de coagulación decrece hasta una temperatura óptima de 40-45°C y luego se vuelve a incrementar hasta que se desnaturalizan las enzimas.

En la industria la coagulación se hace normalmente a 31°C, lejos de la temperatura óptima de coagulación, ya que se necesita incubar en simultáneo a los cultivos de bacterias mesófilas cuya temperatura óptima de crecimiento es 27-28°C. Además, la estructura del coágulo mejora a temperaturas más bajas, por lo tanto esta temperatura se utiliza incluso para los quesos elaborados con cultivos termófilos.

- 7. pH y cultivos lácticos:** Debido al efecto directo del pH en la actividad de los coagulantes, el tiempo de coagulación aumenta con el incremento de este, especialmente encima de pH 6,4. La sensibilidad al pH depende del coagulante usado, por ejemplo el cuajo porcino es muy sensible mientras que los de origen microbianos son prácticamente insensibles.

La firmeza del coágulo se incrementa notablemente disminuyendo el pH, hasta un valor óptimo de 5,9-6,0. Por debajo de este la firmeza disminuye debido a la solubilización de fosfato cálcico coloidal que une a las micelas de caseína de la cuajada (paracaseinato dicálcico).

Si se utiliza una excesiva cantidad de cultivos lácticos o leche ya deteriorada microbiológicamente, se obtiene un aumento en la cantidad de ácido láctico lo que genera un pH bajo en la leche. El ácido láctico desmineraliza a la cuajada formando lactato de calcio (Fig. 10), esto es buscado con el agregado de cultivos lácticos a la leche ya que le confiere la elasticidad deseada al coágulo a medida que aumenta la acidez de la masa.(4).

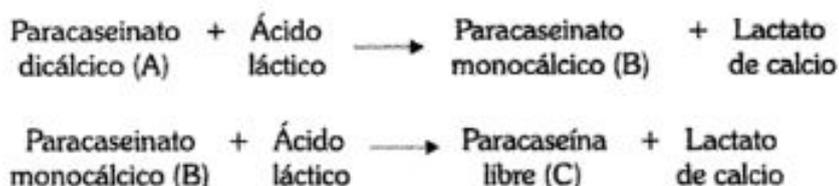


Figura 10: Desmineralización de la cuajada por el ácido láctico

Es decir que el cultivo debe aportar sólo 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 cultivo la acidez disminuye marcadamente en la tina de elaboración, se obtienen quesos con menor concentración de calcio ya que se pierde un exceso de lactato de calcio en el suero.

8. Agregado de CaCl_2 : El agregado de CaCl_2 beneficia a la coagulación de la leche por tres factores principales:

- Incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]$.
- Incrementa la concentración de fosfato cálcico coloidal [CCP].
- Disminuye el pH (el agregado de CaCl_2 0,02% disminuye el pH en $\sim 0,05$ -0,1 unidades, dependiendo del nivel proteico).

Por lo tanto el agregado de CaCl_2 reduce el tiempo de coagulación e incrementa la firmeza del coágulo formado. Sin embargo, el agregado de más de 0,02 g CaCl_2 /L reduce la firmeza del coágulo a niveles similares a los obtenidos con 0,01 g/L. Esto se debe a que el exceso de iones calcio incrementa las cargas positivas de las caseínas, interfiriendo en la agregación de estas. Como es de esperarse, el agregado de quelantes de calcio como el EDTA, reducen la firmeza del coágulo.

La adición de sales monovalentes como NaCl o KCl incrementan la firmeza del gel hasta los 100 mM debido a que intensifican la fuerza iónica, pero lo debilitan notoriamente superando esta concentración ya que el exceso de cationes desplaza a los iones de calcio micelar (Ca^{2+}).

9. Concentración de coagulante: La coagulación en la leche es directamente proporcional a la cantidad de coagulante usado, pero en la práctica no se suele usar más que el suficiente para coagular la leche en 30-40 min (200-200 ml de cuajo standard de becerro [~ 60 RU/ml] cada 1000 ml de leche). Esto se debe a que la cantidad de coagulante retenida en la cuajada también es proporcional a la cantidad utilizada, y un exceso generaría demasiada actividad proteolítica durante la maduración del queso.

Los efectos de los distintos factores que afectan al tiempo de coagulación de la leche se resumen en la Figura 11:

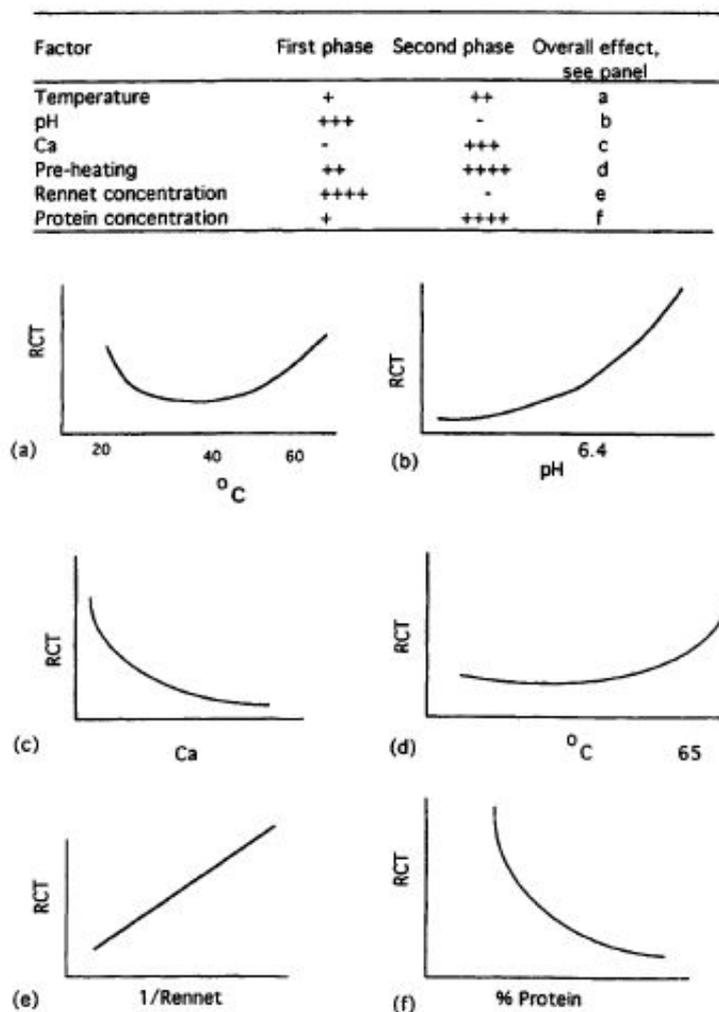


Figura 11: Efectos de los distintos factores (temperatura de trabajo, pH, Ca, precalentamiento, concentración de coagulante y de proteínas) en el tiempo de coagulación de la leche (RCT).

4.3.3- 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.(5).

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 posee otros papeles importantes, como por ejemplo disminuir la tensión arterial.(6).

Respecto del fósforo, es ubicuo en su distribución corporal y es crítico para todos los procesos celulares. Los iones fosfato están involucrados en todos los procesos metabólicos. Muchos alimentos lo contienen en cantidades importantes, por lo tanto en líneas generales no existe déficit de aporte de fósforo.(6).

La fuente fundamental de calcio y fósforo del organismo es la dieta. La ingesta y la digestión controlan la cantidad disponible para la absorción (requerimientos diarios, ver Tabla IV).

TABLA IV: Requerimientos diarios de calcio y fósforo

Categoría	Edad. (años)	Peso	Altura	Calcio	Fósforo
	o condición	(kg)	(cm)	(mg)	(mg)
Lactantes	0,0 - 0,5	6	60	400	300
	0,5 - 1,0	9	71	600	500
Niños	1 - 3	13	90	800	800
	4 - 6	20	112	800	800
	7 - 10	28	132	800	800
Varones	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
Mujeres	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
Embarazo	1er trimestre			1200	1200

Lactantes	1er semestre			1200	1200
	2do semestre			1200	1200

Fuente :FAO/ OMS 2002

4.3.4- Relación calcio fósforo en los alimentos

Cuando no se ingiere suficiente calcio, el cuerpo comienza a abastecerse del 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.(5).(6).

TABLA V: Contenido de calcio y fósforo en alimentos (mg/100 g)

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

4.3.5- Datos estadísticos sobre producción y consumo de lácteos en Argentina

4.3.5.1- Producción láctea argentina

En nuestro país las cuencas lecheras se concentran en: la región noroeste en las provincias de Tucumán (norte) y Salta (centro); y la región Pampeana en las provincias de Santa Fe, Córdoba, La Pampa (noreste), Buenos Aires y Entre Ríos, según se muestra en la figura 12: (33)

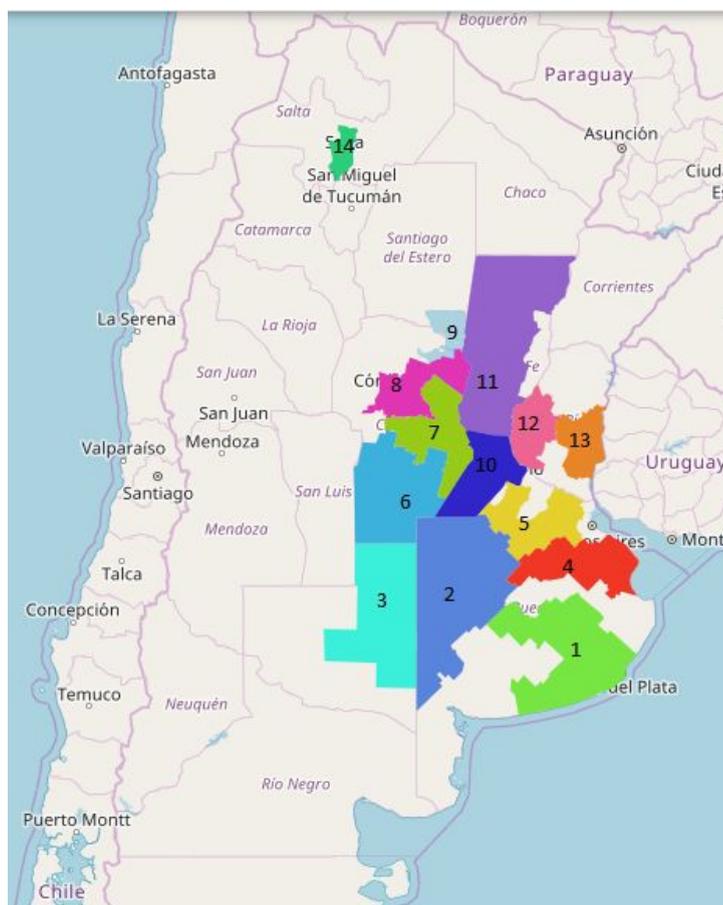


Figura 12: Cuencas lecheras de Argentina

Fuente: SENASA

- 1- Mar y Sierras de Buenos Aires.
- 2- Oeste de Buenos Aires.
- 3- La Pampa.
- 4- Abasto Sur de Buenos Aires.
- 5- Abasto Norte de Buenos Aires.
- 6- Sur de Córdoba.
- 7- Villa María.
- 8- Centro y Noreste de Córdoba.
- 9- Rivadavia de Santiago del Estero.
- 10- Sante Fe Sur.

- 11- Sante Fe Norte.
- 12- Cuenca “A” de Entre Ríos.
- 13- Cuenca “B” de Entre Ríos.
- 14- Cuenca de Trancas.

La distribución de tambos en estas cuencas (densidad de tambos) se puede apreciar en la figura 13, observándose la mayor densidad entre las zonas de Rafaela (centro-oeste de la provincia de Santa Fe) hasta la zona de Villa María (centro-este de la provincia de Córdoba).(19).

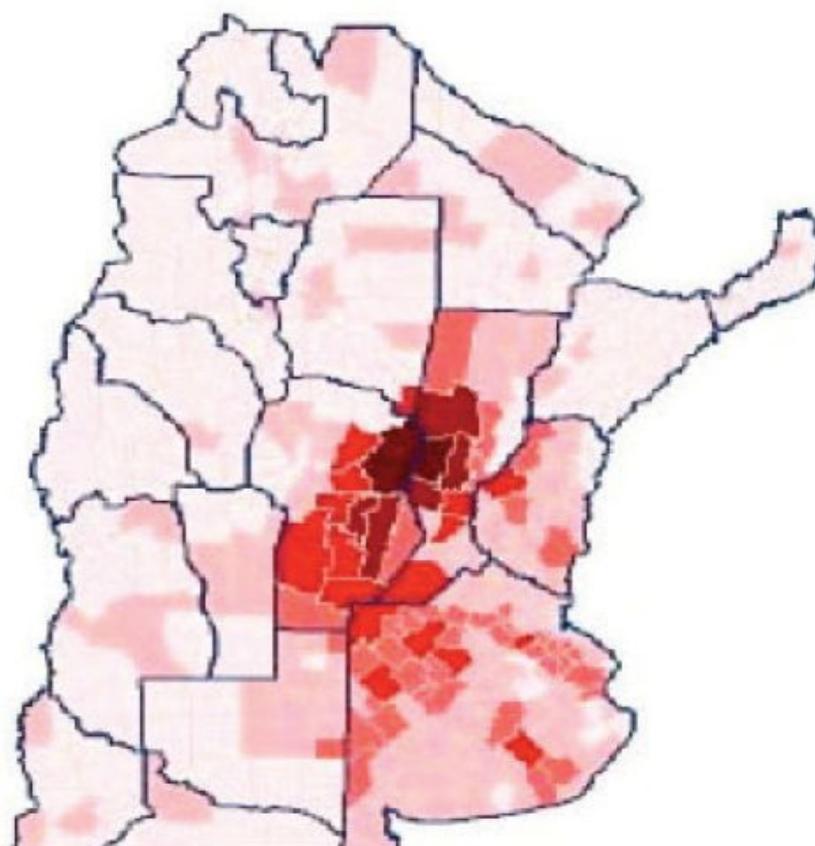


Figura 13: Distribución de los tambos en Argentina

Fuente: SENASA

Para el año 2016, en Argentina se registraron las siguientes estadísticas lácteas (ver tabla VI) provenientes principalmente de las cuencas lecheras recientemente mencionadas.

El total de leche 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.). Otro 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.

TABLA VI: Elaboración de productos lácteos para el año 2016

PRODUCTO	CANTIDAD (millones de litros* o toneladas)
Leche no procesada por la industria (informal)*	742,401
1 - Leche pasteurizada*	983,638
2 - Leche esterilizada*	642,808
3 - Leche chocolatada*	85,913
Total leche fluida formal*	1712,359
1 - Leche en polvo entera	146,386
2 - Leche en polvo descremada	37,117

3 - Queso de pasta dura	77,041
4 - Queso de pasta semidura	188,987
5 - Queso de pasta blanda	268,939
6 - Manteca	34,234
7 - Dulce de leche	130,409
8 - Leche condensada	6,384
9 - Yogur	432,783
10 - Postres lácteos y flanes	54,962
Total productos	1377,242

Fuente: Subsecretaría de Lechería - Ministerio de Agroindustria
 estadisticaslecheria@magyp.gob.ar

Del consumo interno se desglosa la Tabla VII, en la que se aprecian los consumos per cápita de productos lácteos en el año 2016.

TABLA VII: Consumo per cápita de productos lácteos en el año 2016

CONSUMO PER CÁPITA	CANTIDAD (litros)
Leche pasteurizada	23,22
Leche esterilizada	14,87
Leche chocolatada	2,00
Leche en polvo entera	1,43

Leche en polvo descremada	0,16
Queso de pasta dura	1,70
Queso de pasta semidura	3,81
Queso de pasta blanda	5,97
Manteca	0,75
Dulce de leche	2,95
Leche condensada	0,19
Yogur	9,75
Postres lácteos y flanes	1,4

Fuente: Subsecretaría de Lechería - Ministerio de Agroindustria
estadisticaslecheria@magyp.gob.ar

En nuestro país para el año 2016, el 50.27% de los quesos producidos fueron de pasta blanda (Tabla VI). El mayor consumo per cápita de quesos se demostró en los mismos con 5,97 litros de leche por persona en el año, de allí la importancia de su estudio. (34).

4.3.5.2- Producción nacional de quesos

Cabe destacar que las cuencas lecheras son regiones donde prosperan las granjas lecheras de pequeños, medianos y grandes productores, que pueden pertenecer a los tambos productores de productos lácteos, o no. Aquellas granjas que no tienen capacidad de producción, venden la leche cruda a los grandes tambos donde se la procesa y se producen todos los derivados lácteos.

En la tabla VIII se pueden observar los mayores exponentes de estas empresas lácteas que producen y compran leche en las cuencas para producir los quesos nacionales.(30).

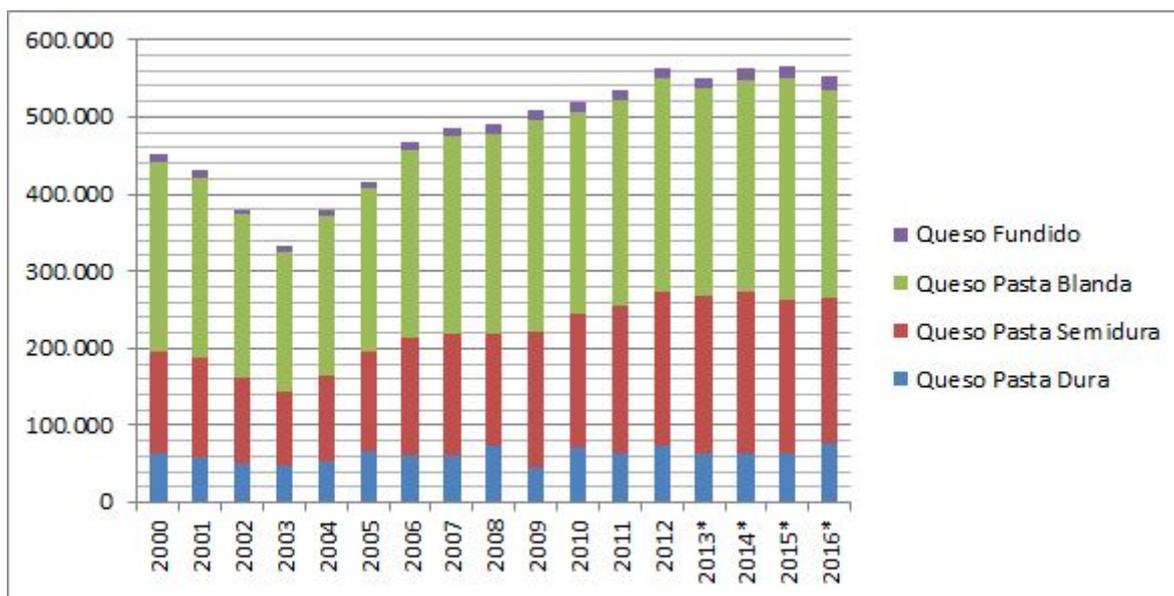
TABLA VIII: Principales fabricantes de queso en el país y sus marcas comerciales

EMPRESA	MARCAS COMERCIALES
Sancor Coop. Unidas Ltda.	SanCor, San Regim, Tholem, Tholem light, Sancor Trocitos, Quesabores, Cabaña Santa Brigida, Chelita
Mastellone Hnos. S.A.	La Serenisima, Ser, Cremón, Finlandia, Casanto, García (ricotta), Pere Ducrest
Danone Argentina	Casancrem clásico y diet, Ser, García
Saputo (ex Molfino)	Molfino, La Paulina, La Paulina light, Ricrem, Marull, Taluhet, Yantar, Val Pineto, Senda, AYR, Tio Pujio
UTE Sancor-DPA	Mendicrim (Original, Suave, Light y 0%), Mendicota
Milkaut S.A.	Milkaut, Santa Rosa, Adler, Bavaria, Bavaria light, Atuel, Fransafé, Chis
Suc. de Alfredo Williner S.A.	Ilolay, Ilolay Vita, Ilolay light
Verónica S.A.	Verónica, Pergamino
Punta del Agua S.A.	Punta del Agua
García Hnos. Agroindustrial	Tregar

Fuente: Dir. de Ind. Alimentaria y Agroindustrias.

En el gráfico I se pueden observar las diferentes producciones anuales de quesos en el país entre los años 2000 y 2016, de las cuales en su mayoría fueron quesos industriales producidos casi exclusivamente por las grandes empresas lácteas nombradas en la tabla VIII.

GRÁFICO I: Producción nacional de quesos (en toneladas) entre los años 2000-2016.



Fuente: Subsecretaría de Lechería* - Ministerio de Agroindustria.

* Datos provisorios elaborados en base a la Resolución 7/2014 y Resolución 230/2016; SAGyP; estadisticaslecheria@magyp.gob.ar

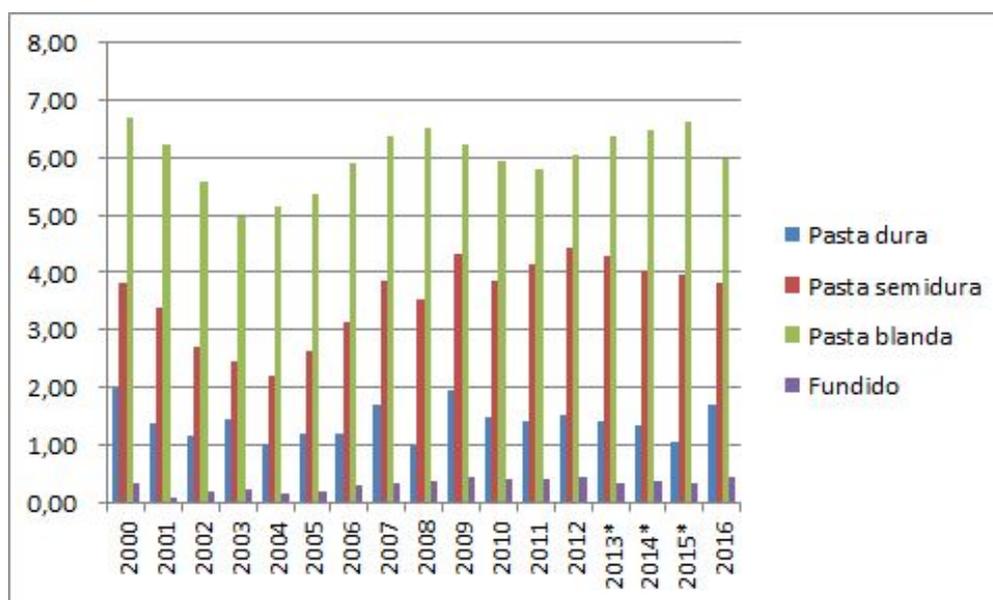
En el transcurso del período 2000-2016 la producción nacional de quesos describió una curva tipo “V” con un pico mínimo en el año 2003, consecuencia lógica de la crisis económica general y la abrupta caída del consumo interno.(9).

Entre 2003 y 2016 la elaboración se incrementó más de un 50%, manteniendo un aumento sostenido hasta 2012, siendo la principal fuente impulsora de este crecimiento el consumo interno y en parte la expansión de las exportaciones. Luego se mantuvo estable hasta un nuevo pico en el año 2015.

A nivel de detalle por pasta se observa que los quesos blandos son los más elaborados en el país y en consecuencia los de mayor interés tecnológico.(34).

4.3.5.3- Consumo nacional de quesos

GRÁFICO II: Consumo nacional per cápita de quesos (kilos por año) entre los años 2000-2016.



Fuente: Subsecretaría de Lechería - Ministerio de Agroindustria.

Como consecuencia de la intensa corriente migratoria 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. Los quesos más consumidos son los de pasta blanda, donde el queso cremoso es el más representativo.(9).

El consumo se mantiene proporcional a la cantidad producida en los mismos años (Gráfico I) con el último pico de consumo per cápita en el año 2015.

Según encuestas del INDEC, para los años 2012/2013, el mayor consumo de quesos blandos dentro del país se registró en la Región Pampeana Principalmente en Gran Buenos Aires, donde se encuentran concentradas las grandes urbes con mayor densidad de población (Fig. 14) y de donde proviene la mayor parte de la producción láctea nacional.(34).

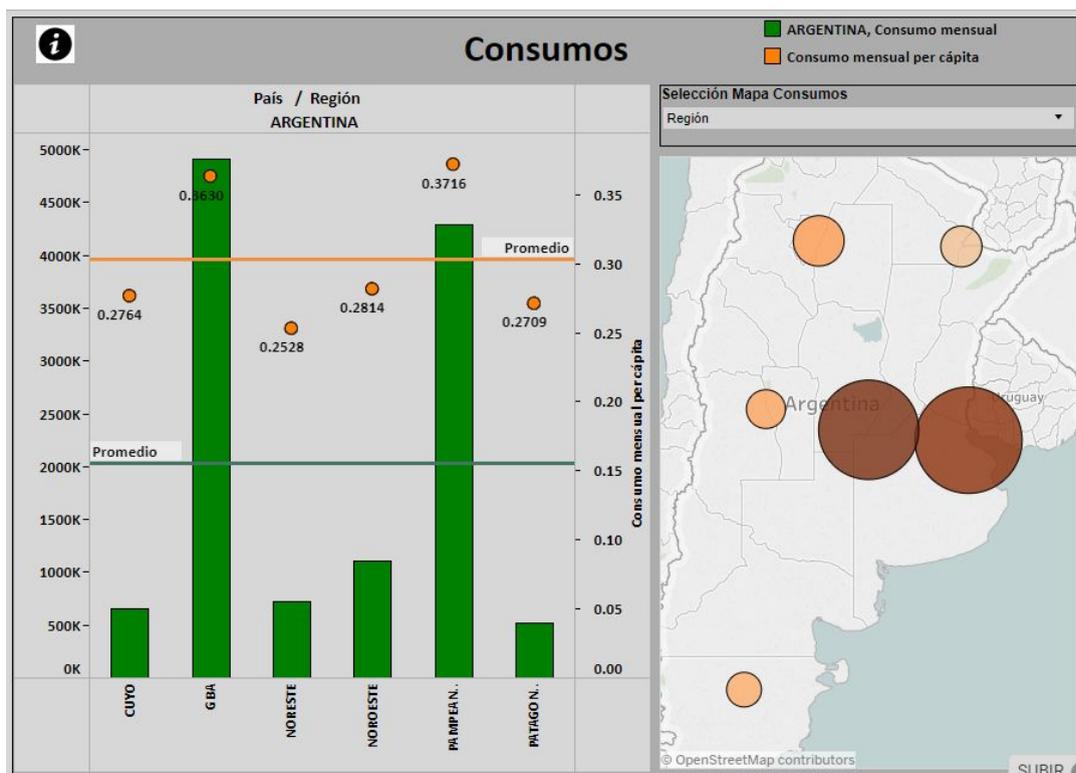


Figura 14: Consumo mensual y per cápita por región nacional (en pesos argentinos) para los años 2012/2013.

4.3.6- Ventajas del queso sobre la leche

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, que varía las características organolépticas y valores nutricionales entre cada uno de ellos.
- 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. 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 Camembert, son mucho más pobres en calcio (0,15 g de Ca / 100 g de queso).(9).

4.3.7- 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 está definido en dicho código 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.

- g) Este producto se rotulará: queso Cremoso Argentino”

(Ley 18284 ‘Código Alimentario Argentino’, Capítulo VIII, Artículo 622 - (Res 22, 30.01.95), actualizado al 03/2019).(32).

En el anexo Mercosur del mismo código, en la resolución GMC N° 063/94, que incluye los quesos de pasta blanda argentinos: Cuartirolo, Cremoso y Criollo (con un contenido acuoso de (46% < HUMEDAD < 55%), se especifican los requisitos microbiológicos que deben cumplir estos (ver tabla IX).(9).(32).

TABLA IX: Requisitos microbiológicos de quesos blandos.

Microorganismos	Criterios de Aceptación	Categoría ICMSF	Métodos de Ensayo
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.

La composición de los quesos cremosos expresada cada 100 g de muestra se ve en la tabla X, no se encontraron datos de la composición mineral de los mismos. Como se puede ver en ésta los minerales se engloban en el término cenizas sin hacer un detalle de sus componentes, entre ellos el calcio y el fósforo.

TABLA X: 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

Pero gracias a la bibliografía nacional sabemos que experimentalmente los quesos blandos comerciales que se venden en supermercados del país tienen un promedio de: aproximadamente 700 mg de Ca/100 g de muestra (~1400 mg de Ca/100 g b.s. Este valor es muy próximo al doble ya que los quesos blandos tienen entre ~50% de humedad) y 500 mg de P/100 g de muestra (~1000 mg de P/ 100 g b.s.).(9).

Estas cantidades logran que los quesos comerciales que se consumen en el país tengan una relación Ca/P óptima (>1) que ronda entre los valores 1,2 - 1,4 dependiendo del origen del queso.

4.3.8- Elaboración de quesos. Características generales

La elaboración de quesos implica tres etapas fundamentales:

1. **Formación del gel de caseína.**
2. **Deshidratación parcial del gel por sinéresis.**
3. **Maduración enzimática del gel deshidratado.**

1. 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 coagulación puede ser ácida (quesos o cuajadas ácidas, quesos en pote) o enzimática (la mayoría de los quesos con forma que se conocen en el mundo) como ya fue explicado en el punto 4.3.2.2.

Si la leche utilizada es de pobre aptitud para la fabricación de queso, el coágulo formado será blando. Ello da lugar a grandes pérdidas de finos (partículas de caseína), así como de grasa, además de una sinéresis inadecuada durante el proceso de fabricación del queso.

Para restablecer el equilibrio salino dentro de la micela, consecuencia del tratamiento térmico o de la disminución del pH de la leche, normalmente se adicionan de 5-20 gramos de cloruro cálcico (CaCl_2) por cada 100 kg de leche. Una adición de más de 40 gramos de cloruro cálcico por cada 100 kg de leche deja de ser funcional por que se pierde en el suero durante el proceso de desuerado (pico máximo de unión).(17).

2. 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 y fósforo fundamentalmente) que inicialmente formaban la leche.

3. 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.(9).

4.3.9- Queso cremoso. Tecnología de elaboración

Es el queso de mayor consumo en el país y como ya vimos representa casi el 50% de la producción nacional de quesos. Se lo consume como producto de mesa, pero tiene muchas aplicaciones culinarias.

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.(9).

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 CaCl_2 a razón de ~ 0,01 g/ L, 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.(26).

En cuanto al fermento láctico utilizado, puede ser un fermento natural de leche obtenido en la misma industria, o un fermento comercial de bacterias acidolácticas termófilas o mesófilas. 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 semidirectos, en primer lugar se hace un precultivo que luego es agregado a la leche; El precultivo se prepara en cada elaboración.

Las funciones de los fermentos iniciadores en la cuajada son:

- Facilitar la formación del coágulo.
- Facilitar la retracción del coágulo y desuerado (sinéresis).
- Dar elasticidad al coágulo.
- Facilitar su unión (firmeza).
- Acidificar.
- Inhibir el desarrollo de patógenos.
- Influir en la maduración (generación de compuestos aromáticos y sápidos por proteólisis y lipólisis).
- Asegurar la homogeneidad del producto.(28).

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 a 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 (cantidad de ácido láctico) se controlan en la cuajada y en el suero que exuda la cuajada. Una vez que el pH de la masa alcanzado $5,2 \pm 1$ (65° Dornic en el suero exudado), los quesos son sumergidos en salmuera a $5^\circ \pm 1$ C a fin 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.(26).(27).

En la figura 15 se puede observar un esquema de la elaboración de queso cremoso Argentino.

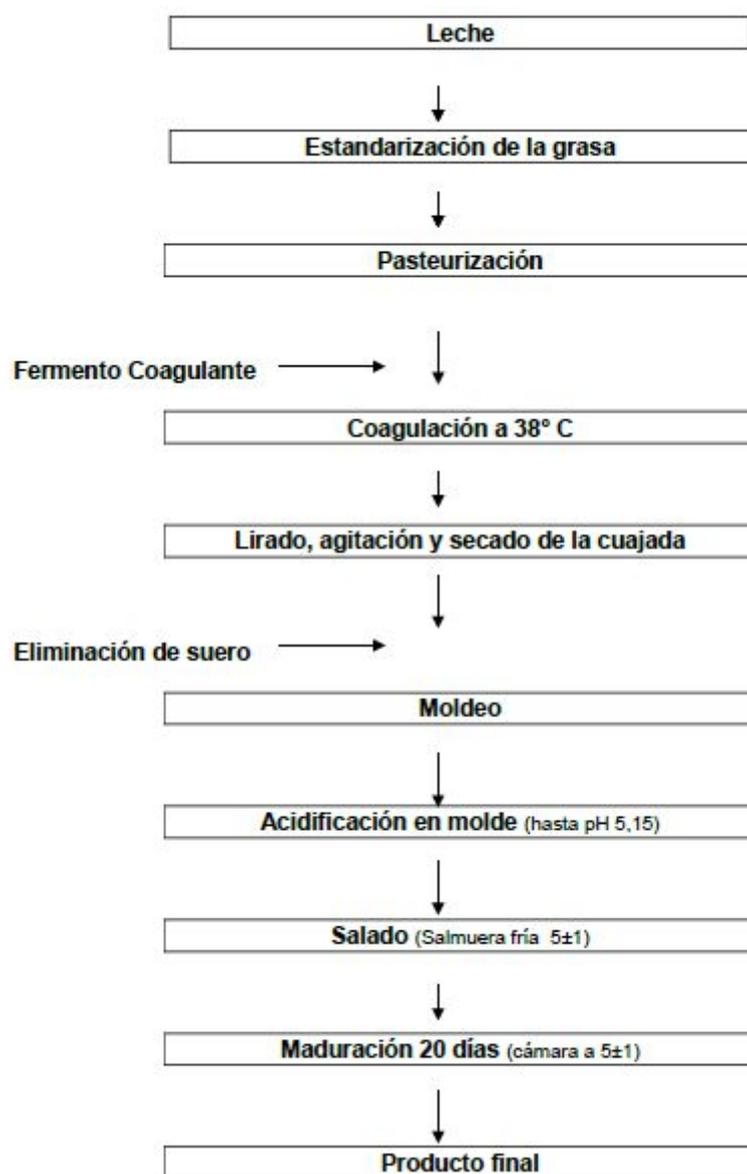


Figura 15: Esquema de elaboración de queso cremoso en Argentina.

4.4- Objetivos

4.4.1- Objetivo General

El objetivo de esta investigación es evaluar métodos exactos y repetibles para la cuantificación de iones calcio y fósforo disueltos en la fase acuosa de quesos blandos, provistos por la planta piloto de Chr. Hansen que opera en UADE (Universidad Argentina de la Empresa, Lima 700, CABA, Arg.).

4.4.2- Objetivo Específico

Los objetivos específicos de esta investigación son:

- Recopilar bibliografía sobre el tema.
- Seleccionar y poner a punto un método eficiente para la extracción de la fase acuosa de la matriz del queso cremoso brindado por Chr. Hansen.
- Seleccionar y poner a punto (repetibilidad y recuperación) los métodos para las determinaciones de iones calcio y fósforo en dicha fase acuosa.
- Realizar los análisis anexos que nos van a ayudar a comparar resultados y a tener un mejor perfil de la muestra (humedad, calcio y fósforo total, etc.).

5- ANTECEDENTES

5.1- Antecedentes previos generales

J. A. Lucey y P. F. Fox (22) fueron de los primeros en determinar la importancia del calcio y el fosfato en la elaboración del queso. Demostrando su importante rol en las uniones del CCP con las caseínas, como se comportan estas uniones ante diferentes parámetros de elaboración y cómo influyen estos en la estructura y textura de diferentes quesos como Mozzarella, Cheddar y Camembert.

A. Hassan, M. E. Johnson y J. A. Lucey (21) estudiaron sobre la relación que tienen el CCP soluble y el insoluble, los catalogaron como indicadores de la textura de los quesos y lo cuantificaron en queso cheddar para ver cómo variaban durante el proceso de maduración. El CCP soluble lo cuantificaron midiendo el calcio, por espectrofotometría de absorción atómica, del extracto acuoso del queso extraído por altas presiones hidráulicas. El CCP insoluble lo midieron a través de la capacidad buffer del queso que es proporcional a la cantidad de CCP unido a las micelas. Descubrieron que durante la maduración hay una tendencia del CCP a pasar del estado insoluble al soluble, y que es el CCP insoluble el que cumple el rol clave en la textura firme del queso.

María Del Carmen, Pedro (9) estudió el contenido de calcio y fósforo totales en quesos blandos argentinos, comerciales y elaborados en planta piloto. Demostrando cuáles son los mejores métodos para cuantificar estos iones, y cómo varían durante la fabricación de quesos con diferentes parámetros de elaboración.

Chr. Hansen terceriza estas determinaciones, por lo cual, este trabajo es pionero en el desarrollo de un método que sea aplicable y repetible al análisis de calcio y fósforo solubles en quesos blandos, los de mayor consumo en el mercado Argentino.

6 - METODOLOGÍA DE DESARROLLO

6.1 - Procedencia de las muestras

Las muestras fueron provistas por Chr. Hansen, siendo quesos blandos elaborados en la Planta Piloto de Chr. Hansen ubicada en el piso -2 (subsuelo) de los laboratorios de la Universidad Argentina de la Empresa (UADE Labs, UADE, Lima 700, CABA, Arg.).

Estos quesos fueron elaborados mediante diferentes técnicas y especificaciones, variando así sus características entre lote y lote. Con la similitud de que fueron fraccionados en barras de 0,6 - 1,2 kg, envasados al vacío y congelados en ultrafreezer a -50°C al primer o segundo día desde su elaboración (D+1, D+2, etc.) hasta el momento del análisis (Fig. 16).

(Ver detalles de las muestras en Anexo A)



Figura 16: Formato de queso blando provisto por la planta piloto de Chr. Hansen

6.2 - Tratamiento de las muestras

Las muestras permanecieron congeladas a -50°C desde su elaboración, y 24 hs antes de realizar las determinaciones fueron descongeladas en heladera a $4-6^{\circ}\text{C}$.

6.3 - Toma de muestra

Las muestras de queso se cortaron con cuchilla hasta conseguir una masa triturada homogénea, con una granulometría de aproximadamente 2mm x 2mm (Fig. 17)



Figura 17: Horma de queso triturada en el laboratorio

Del triturado se tomaron porciones de aproximadamente 1g para las determinaciones de humedad total, calcio total y fósforo total. Para extraer los jugos se tomaron 800 g y se determinó calcio soluble y fósforo soluble en éstos.

6.4 - Determinación de humedad total

La humedad total se analizó de dos formas:

- Método por evaporación (gravimétrico): Según la norma FIL-IDF 4a:1982.(23).

Se pesó entre 1 y 3 g de muestra del queso desgranado y se colocó con ayuda de espátula en pesafiltros de vidrio secos y tarados, 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 llevaron a estufa de convección forzada a $102^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 2 hs (con sus tapas abiertas) y

luego se dejaron enfriar en desecador hasta temperatura ambiente. Una vez fríos se taparon y pesaron, luego de esta pesada se repitieron las secadas en horno a $102^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por lapsos de $\frac{1}{2}$ hora hasta peso constante (variación entre pesadas de menos de 2 mg). Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

El contenido de humedad se calculó mediante la expresión (1):

$$\%H = \frac{(m1-m2)}{m1} * 100 \quad (1)$$

Donde:

%H: porcentaje de humedad.

m1: peso de la muestra antes de entrar a estufa.

m2: peso de la muestra después de salir de estufa.

- Método directo (Balanza de infrarrojo):

Si bien se trata de un método rápido y práctico, al evaluarse los valores obtenidos no resultaron confiables. En primer lugar porque no coincidían con los resultados del método por evaporación y en segundo lugar porque de una misma muestra analizada por triplicado se obtuvieron valores dispares. Por estos motivos se decidió continuar con el método gravimétrico.

6.5 - Tratamiento de la muestra para la determinación de calcio y fósforo totales

Se obtuvieron cenizas blancas, para esto se tomaron muestras de aproximadamente 1 g del queso desgranado y se colocaron con ayuda de espátula en crisoles de cerámica (por triplicado). Como la muestra de queso contiene cantidades considerables de materia grasa, se llevó previamente a masa carbonosa en mechero (Fig. 18), de esta manera se evitó la ignición de la muestra y la consecuente pérdida por proyecciones. Luego se llevó a mufla hasta

temperatura de calcinación (500-550°C) hasta obtener cenizas blancas (Fig. 19), una vez obtenidas se retiraron los crisoles de la mufla y se enfriaron en desecador.(2).



Figura 18: Carbonización de la muestra.



Figura 19: Calcinación de la muestra en mufla.

6.6 - Determinación de Ca total

Se realizó por espectrometría de absorción atómica; fundamentado en la tesis de *“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”* (María del Carmen, Pedro. 2012) (9). Se realizó una evaluación de los métodos más convenientes para determinar calcio en quesos blandos (ver Anexo B), donde se concluyó que la espectrometría de absorción atómica y la potenciometría directa con electrodo selectivo de calcio son los métodos más recomendables por su exactitud y precisión. Si bien ellos prefirieron la potenciometría por su bajo costo, nosotros optamos por la espectrometría de absorción

atómica debido a la accesibilidad que tenemos a este equipo en el laboratorio de UADE Labs (*PERKIN ELMER AAnalyst 100*) (Fig. 20).

Para el ensayo se realizó en el equipo una curva de calibración de cinco puntos con valores de 0 - 8 mg/L de calcio, desde un patrón de calcio 1000 mg/L disuelto en ácido nítrico (HNO_3) 0,5 M (ver Anexo C).

Para determinar el calcio total se disolvieron las cenizas blancas (obtenidas previamente en el punto 6.5) en ácido nítrico 0,5 M y se filtraron colocándolas, junto a 4 ml de cloruro de lantano (LaCl_3) 5%, en matraces aforados de 200 ml enrasados. La concentración de estos matraces se midió en el equipo y por dar siempre valores más altos que los configurados en la curva de calibración se fueron realizando diluciones hasta encontrar una fracción que se ajuste al centro aproximado de la curva y dé un valor de concentración de calcio válido.(3).



Figura 20: Equipo de absorción atómica para la determinación de Calcio

6.7 - Determinación de P total

Se realizó colorimétricamente en un espectrofotómetro UV- VIS según el método de la AOAC 99125 Official Methods of Analysis (12). Se realizó una curva de calibración de cinco puntos con valores de 2 - 10 mg/L de fósforo, pesando a partir de un patrón sólido de KH_2PO_4

(previamente secado en estufa a 105°C). A cada patrón se le agregó 10 ml de una solución de molibdovanadato (preparada a partir de una sal de molibdato y una sal de vanadato), se enrasó a 50 ml con agua destilada y se leyó la absorbancia a 400 nm. Se realizó la curva de calibración, graficando absorbancia versus logaritmo de la concentración. Se obtuvo la ecuación de la recta con adecuado coeficiente de correlación R (ver Anexo D).

Para analizar las muestras, se tomó un volumen de 5 ml (de la solución preparada con las cenizas del punto 6.5) y se agregaron los reactivos necesarios para desarrollar el color (10 ml de reactivo enrasado en matraz aforado de 25 ml con HNO₃ 0,5 M) . El equipo utilizado para tal fin fue un espectrofotómetro UV-VIS. (*SHIMADZU UV-1280*) (Fig. 21)



Figura 21: Equipo de espectrofotometría para la determinación de Fósforo.

6.8 - Tratamiento de la muestra para la determinación de calcio y fósforo solubles (extracción de la fase acuosa).

La extracción del jugo o fracción líquida del queso se basó en un método físico de altas presiones en prensa hidráulica de banco (Morris et al. (1988) y Lucey et al. (1993a)).(19)

Se pesaron 800 g de queso desgranado en un lienzo quesero y se colocaron entre dos cuencos de acero inoxidable, agujereados en toda su superficie, uno dentro de otro para presionar homogéneamente la masa de queso (Fig. 22). Esta preparación se dispuso encima de un cuenco de mayor tamaño de acero inoxidable sin agujerear simil bandeja, que funcionó de receptáculo para el jugo que se fue extrayendo por los orificios.



Figura 22: Sistema de prensado

Este sistema de piezas se colocó a temperatura ambiente en una prensa de banco con un pistón hidráulico en su parte superior (Fig. 23) que realizó una fuerza mecánica de empuje contra el primer cuenco ubicado dentro del segundo, aumentando así la presión de la masa de queso en el recinto y forzando a la fase líquida a escaparse por los orificios. (Fig. 24)



Figura 23: Prensa de banco accionando el sistema.



Figura 24: Prensado del queso.

El jugo fue recolectado cada 15 min con la ayuda de una jeringa descartable y puesto en tubos plásticos de centrifugado de 50 ml, aumentando progresivamente la presión entre las extracciones hasta que dejó de drenar.

Una vez recolectado el jugo del queso en los tubos, debieron limpiarse de grasa y sólidos en suspensión; para esto se enfriaron en heladera a 5°C por 15 min para solidificación de la fase grasa y se les retiró dicha fase con varilla de vidrio. Esta fase acuosa se centrifugó a $\sim 2000 \times g$ por 10 min a 4°C para remover cualquier partícula extraña de grasa o de sólidos en suspensión.

Se tomó 1 ml del centrifugado en un matraz de 50 ml, junto a 10 ml de tricloroacético (TCA) 24% para precipitar las proteínas, y se enrasó con ácido nítrico 0,5 M; Se homogeneizó y filtró en vasos de precipitados, de éstos se tomó una alicuota de 2 ml y enrasó con ácido nítrico 0,5 M en otro matraz aforado de 50 ml.

Este extracto acuoso ya limpio se reservó en heladera para las determinaciones de calcio y fósforo solubles.(19)

6.9 - Determinación de Ca soluble

De igual forma que la determinación de calcio total del punto 6.6, el Ca fué determinado por absorción atómica pero del extracto acuoso resultante del punto 6.8.

Se midió la absorbancia en una curva de calibración configurada de 0 - 8 mg/L y cuando sobrepasaba el valor máximo se realizaron diluciones hasta lograr un valor cercano al centro de esta.

6.10 - Determinación de P soluble

De igual forma que la determinación de fósforo total del punto 6.7, el P fue determinado por espectrofotometría a 400 nm pero del extracto acuoso resultante del punto 6.8.

Se midió la absorbancia en una curva de calibración configurada entre 0 - 8 mg/L y cuando sobrepasaba el valor máximo se realizaron diluciones hasta lograr un valor cercano al centro de esta.

7 - DISCUSIÓN

7.1 - Resultados

7.1.1 - Resultados de humedad total

TABLA XI: Resultados de las determinaciones de humedad.

Muestra	Humedad (%m/m)
QUESO 1	50,63
QUESO 2	50,46
QUESO 3	50,45
QUESO 4	46,53
QUESO 5	52,43
QUESO 6	56,00
QUESO 7	49,02
QUESO 8	49,83
QUESO 9	49,80
QUESO 10	52,08
QUESO 11	51,76
QUESO 12	50,87

QUESO 13	49,61
QUESO 14	50,88
QUESO 15	49,42
QUESO 16	52,58
QUESO 17	49,56
QUESO 18	51,73
PROMEDIO	50,75

*Detalle de las muestras en Anexo A

7.1.2 - Resultados de calcio total

TABLA XII: Resultados de las determinaciones de calcio total.

Muestra	Cantidad de Calcio Total (mg/100g queso)
QUESO 1	1007,0
QUESO 2	1003,6
QUESO 3	878,6
QUESO 4	800,0
QUESO 5	1089,8
QUESO 6	952,5

QUESO 7	1002,4
QUESO 8	613,4
QUESO 9	628,1
QUESO 10	577,5
QUESO 11	586,0
QUESO 12	632,2
QUESO 13	667,7
QUESO 14	655,7
QUESO 15	564,9
QUESO 16	503,7
QUESO 17	572,9
QUESO 18	497,3
PROMEDIO	735,18

*Detalle de las muestras en Anexo A

7.1.3 - Resultados de fósforo total

TABLA XIII: Resultados de las determinaciones de fósforo total.

Muestra	Cantidad de Fósforo Total (mg/100g queso)
QUESO 1	779,1
QUESO 2	780,6
QUESO 3	686,5
QUESO 4	679,4
QUESO 5	851,4
QUESO 6	710,9
QUESO 7	780,5
QUESO 8	473,8
QUESO 9	513,7
QUESO 10	451,2
QUESO 11	361,0
QUESO 12	342,8
QUESO 13	467,6
QUESO 14	441,6

QUESO 15	418,5
QUESO 16	395,0
QUESO 17	428,9
QUESO 18	380,1
PROMEDIO	552,37

*Detalle de las muestras en Anexo A

7.1.4 - Resultados de las extracciones de humedad

Para expresar la cantidad de jugos extraídos del queso se hizo una relación según la humedad de cada uno, según el siguiente cálculo (2):

$$\%He = \left(\frac{Ve}{M * \frac{\%H}{100}} \right) * 100 \tag{2}$$

Donde:

%He: Porcentaje de humedad extraída del queso

Ve: Volumen de jugo extraído del queso (ml)

M: Masa de queso prensada (gr)

%H: Humedad total del queso (% v/m)

TABLA XIV: Resultados de las cantidades de jugo extraídas.

Muestra	Humedad extraída (% v/m)
QUESO 1	Sin extracción de líquido
QUESO 2	Sin extracción de líquido

QUESO 3	Sin extracción de líquido
QUESO 4	Sin extracción de líquido
QUESO 5	28,0
QUESO 6	30,4
QUESO 7	28,7
QUESO 8	26,3
QUESO 9	24,0
QUESO 10	27,9
QUESO 11	34,3
QUESO 12	26,2
QUESO 13	27,9
QUESO 14	25,9
QUESO 15	30,4
QUESO 16	26,0
QUESO 17	28,1
QUESO 18	32,6
PROMEDIO	28,3

*Detalle de las muestras en Anexo A

7.1.5 - Resultados de calcio soluble

Para expresar la cantidad de calcio soluble del queso se hizo una relación entre la concentración del calcio presente en los jugos extraídos y la humedad promedio de cada uno, según el siguiente cálculo (3):

$$[Ca]_2 = [Ca]_1 * \%H * 100$$

(3)

Donde:

$[Ca]_1$: mg de calcio soluble / Litro de jugo extraído

$[Ca]_2$:mg de calcio soluble / 100 g de queso

%H: Humedad total del queso (% v/m)

TABLA XV: Resultados de las determinaciones de calcio soluble.

Muestra	Cantidad de Calcio Soluble (mg/100g queso)		
	15 min	30 min	45 min
QUESO 1	Sin extracción de líquido	Sin extracción de líquido	Sin extracción de líquido
QUESO 2	Sin extracción de líquido	Sin extracción de líquido	Sin extracción de líquido
QUESO 3	Sin extracción de líquido	Sin extracción de líquido	Sin extracción de líquido
QUESO 4	Sin extracción de líquido	Sin extracción de líquido	Sin extracción de líquido

QUESO 5	345,18	334,61	339,60
QUESO 6	420,33	344,73	327,82
QUESO 7	367,99	301,81	288,43
QUESO 8	161,20	171,86	171,88
QUESO 9	161,07	171,76	171,66
QUESO 10	176,08	173,97	187,30
QUESO 11	237,31	241,58	236,54
QUESO 12	207,16	200,61	205,38
QUESO 13	214,87	202,22	219,71
QUESO 14	212,48	210,64	223,87
QUESO 15	197,55	199,71	211,27
QUESO 16	141,96	128,22	155,63
QUESO 17	167,01	132,63	180,21
QUESO 18	186,68	125,96	169,60

*Detalle de las muestras en Anexo A

7.1.6 - Resultados de fósforo soluble

TABLA XVI: Resultados de las determinaciones de fósforo soluble.

Muestra	Cantidad de P Soluble (ppm)
QUESO 1	Sin extracción de líquido
QUESO 2	Sin extracción de líquido
QUESO 3	Sin extracción de líquido
QUESO 4	Sin extracción de líquido
QUESO 5	< 2
QUESO 6	< 2
QUESO 7	< 2
QUESO 8	< 2
QUESO 9	< 2
QUESO 10	< 2
QUESO 11	< 2
QUESO 12	< 2
QUESO 13	< 2
QUESO 14	< 2

QUESO 15	< 2
QUESO 16	< 2
QUESO 17	< 2
QUESO 18	< 2

*Detalle de las muestras en Anexo A

7.2 - Limitaciones y dificultades

a. Escasez de material bibliográfico:

Al ser un método en desarrollo y enfocado a los quesos de mayor consumo en Argentina, no se encontraron estudios a nivel mundial que hayan realizado el mismo ensayo.

Solución: Se recopilaron investigaciones que estudiaban por separado distintos puntos a encarar en el desarrollo, y en base a éstos, se desarrolló un método propio.

b. Diferencias con la mezcla original para la extracción de los jugos del queso:

El método seleccionado para la extracción (21), mezclaba 800 g de queso *cheddar* con 1000 g de arena (calidad analítica) para realizar la prensada.

Se intentó reiteradas veces hacer este ensayo con los quesos blandos de muestra pero no se tuvo éxito, la arena absorbía toda la humedad, impidiendo el drenaje de los jugos.

Solución: Se dejó de utilizar arena y se prensó solo la masa del queso (descongelado y triturado), al hacer esto se lograron extraer buenas cantidades de jugos.

c. Definición de la masa inicial de queso a prensar:

Al modificarse la cantidad de masa inicial de prensado, se empezaron a triturar y prensar las hormas de queso en su totalidad, pero teniendo una variabilidad de peso aproximada entre 500 g - 1500 g por horma. El método perdía normalización.

Solución: Se empezó a prensar sólo masas de queso de aprox. 800 g, anotando la masa inicial de cada uno y el volumen extraído. Esto permitió que las muestras sucesivas tengan valores similares entre ellas.

d. Definición del tiempo de prensado:

El método bibliográfico (21), hablaba de prensar la masa de queso *cheddar* con arena durante 3 hs a 80 bar. Realizando esto se demostró que la mayor parte de los jugos se drenaron antes de la primer hora, y para optimizar el método se probó acortar los tiempos de extracción, lo cual dejó a definir si las fracciones extraídas a distintos tiempos poseían la misma concentración de iones.

Solución: Se fueron retirando los jugos extraídos cada 15 min con presión progresiva, hasta que dejaba de salir jugo o se rompían los lienzos por altas presiones; Y luego se midieron las concentraciones de los iones.

Al hacer esto, se observó que:

- Con 3 extracciones de 15 min (45 min) drenaba el mayor porcentaje de los jugos, ya que a más tiempo y presión se rompían los equipos y el líquido salía con muchas partículas de sólidos mayores.
- Las concentraciones de iones calcio soluble (ya que los iones fósforo en el extracto fueron nulos) no fueron constantes y tendían a disminuir en el minuto 30 para volver a equilibrarse en el minuto 45 dando así una tendencia de parábola positiva en las concentraciones medidas (Ver ANEXO E).

Analizando esto se concluyó que con una prensada unificada de 45min a presión progresiva era suficiente para obtener los jugos del queso blando.

e. Definición de la presión de prensado:

De la misma manera que en el punto anterior, el método (21) hablaba de prensar queso *cheddar* durante 3hs a 80 bar.

Mientras se fueron tomando las alícuotas de jugo cada 15', se fué aumentando gradualmente la presión hasta cerca de los 80 bar. Al realizar esto quedó en evidencia que la mayor parte de los jugos (aprox. 80%) se extrajeron con menos de 10 bar de presión, y que al llegar aproximadamente a los 40 bar siempre se rompía el lienzo o se empezaba a deformar el metal del molde superior, afectando así el punto de apoyo de la prensa y perdiendo eficiencia en el proceso (Fig. 25).



Figura 25: Pérdida de presión por rotura del lienzo.

Solución: Se concluyó que con una prensada unificada de 45 min llegando hasta 20 bar de presión progresivamente es suficiente para extraer la mayor parte de los jugos internos del queso.

f. Cuantificación de los jugos prensados:

Al prensar la masa de queso, parte de los jugos quedaron en la misma masa (agua con mayor interacción a los sólidos) y otra parte fue absorbida por el lienzo que al ser de fibras orgánicas tenía mucha afinidad por el agua liberada, interfiriendo así en el porcentaje final real del líquido extraído.

Solución: Al tener estas limitaciones, se tomó para el porcentaje de jugo extraído solo al volumen recolectado en el cuenco, se despreció el absorbido por el lienzo y el restante en la masa de queso prensado, ya que para el método no son utilizables y pertenecen a la merma misma del proceso, considerando esto se obtuvo un promedio de extracción del 28,3% de la humedad total del queso.

g. Incapacidad para poder desarrollar una técnica de recuperación:

Al recibir las muestras de queso blando para análisis por parte de Hansen. no se tuvo acceso a modificar parámetros de elaboración. Al tratarse de una matriz sólida, no se pudieron agregar cantidades conocidas de calcio y fósforo para poder evaluar una técnica de recuperación.

Posible solución: comparar los resultados obtenidos utilizando la técnica desarrollada en esta tesis con resultados de un laboratorio que realice estos análisis.

7.3 - Conclusiones

7.3.1 - Conclusiones del método utilizado

a. Se concluyó la siguiente técnica para obtener los jugos del queso: *Prensar una masa inicial de 800 g de queso blando por 45 min con presión progresiva hasta 20 bar.*

Los jugos obtenidos representan aproximadamente un tercio de la humedad total del queso y serán los utilizados para el análisis de los iones solubles.

b. La técnica lograda permitió un límite de cuantificación de: Ca 1 mg/L y P 2 mg/L. Y la evaluación estadística reveló que el método es repetible ya que los resultados no presentaron diferencias significativas en el contenido de calcio soluble independientemente del pH o de la fecha de elaboración.

Esto se pudo observar en el ANEXO F donde los p-values de las variables fueron los esperados ($p > 0,05$).

7.3.2 - Conclusiones sobre las muestras utilizadas

a. Las mediciones de calcio total y fósforo total en los quesos analizados fueron aproximadas a las esperadas según las fuentes bibliográficas. Y también se pudo observar que guardaron una relación Ca/P esperada entre 1-1,4 con un promedio de 1,34 (Ver ANEXO G).

b. No se pudo cuantificar el fósforo soluble en el líquido de extracción ya que las mediciones estaban por debajo del límite inferior del intervalo dinámico lineal ($< 2\text{ppm}$).

c. En el ANEXO H se analizó el comportamiento del calcio soluble y la humedad extraída de los quesos con respecto al pH medido para cada una de sus tinas. Se pudo concluir que los quesos provenientes de las tinas con menor pH de coagulación (pH 6,24; Tina 2 de la elaboración 16/04) tuvieron un 25% más de calcio soluble respecto de los quesos de la Tina 1 (pH 6,50) y 1 % más de humedad, lo cual permitió extraer mayor cantidad de jugo a altas presiones.

Esto puso en evidencia que los quesos coagulados a menor pH tienen una menor capacidad de retención del Ca^{2+} como CCP dentro de las caseínas, y mayor dificultad para la sinéresis, dando valores de humedad mayores.

TABLA XVII:

Comparación de las proporciones de calcio soluble entre las tinas a diferentes pH

Tina	Muestra	Ca soluble (Mg Ca/100g queso)	% Ca sol/Ca total	pH (suero de corte)	Promedio
1	QUESO 8	168,3	27,4372	6,5	29,36722
1	QUESO 9	168,2	26,7791	6,5	
1	QUESO 13	212,3	31,7957	6,5	
1	QUESO 14	215,7	32,8961	6,5	
1	QUESO 17	160	27,928	6,5	
2	QUESO 6	364,3	38,2467	6,24	36,79525
2	QUESO 11	238,5	40,6996	6,24	
2	QUESO 15	202,8	35,9001	6,24	
2	QUESO 18	160,8	32,3346	6,24	

8 - BIBLIOGRAFÍA

LIBROS:

- 1) AOAC OFFICIAL METHOD 944.03. *Calcium in Flour Titrimetric Method First Action*. 1995.
- 2) AOAC OFFICIAL METHOD. 994.25. 16th Ed. Chapter 33.7.01. *Toma de muestra de quesos*. 1995.
- 3) AOAC OFFICIAL METHOD 99125. Chapter 33 p. 81. *Calcium, magnesium, and phosphorus in cheese. Atomic absorption Spectrophotometric and colorimetric methods*. 2007.
- 4) BELLADONA BERNAL, Salvador. *Introducción a la tecnología de alimentos*. Academia de Área de Plantas Piloto de Alimentos. Segunda Edición. 2004.
- 5) BLANCO, Antonio. *Química Biológica*. Editorial Ateneo. 2006.
- 6) BOWMAN, Bárbara y RUSSEL M. Robert. *Conocimientos actuales sobre nutrición*. 8va edición. Organización Panamericana de la Salud. 2003.
- 7) FOX, P.F., GUINEE, T.P., COGAN, T.M., MC SWEENEY, P.L.H. *Fundamentals of Cheese Science*. Primera edición. Springer US. 2000.
- 8) MAHAUT, M., JEANTET, R. y BRULÉ, G. *Introducción a la Tecnología Quesera*. Editorial Acribia. 2003
- 9) MARÍA DEL CARMEN, Pedro. *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*. Argentina: Instituto de Lactología Industrial y Asignatura Química Analítica, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. 2012.

-
- 10) MONTGOMERY, D. C. *Diseño y Análisis de Experimentos*. Segunda Edición.. Universidad Estatal de Arizona. 1991.
 - 11) NORMA INTERNACIONALE FIL-IDF 33 B, 216-221. *Determinazione del tenore in fosforo totale*. 1982.
 - 12) ORION RESEARCH. *Handbook of electrode technology*. 1982.
 - 13) SCARAMAL, Luis O. *Bioquímica de los Alimentos*. Buenos Aires: UADE, 2012. Leche, p. 26-36, 2do cuatrimestre. 2012.
 - 14) SPREER, E. *Lactología Industrial*. Editorial ACRIBIA S.A. 1991.
 - 15) RAMÍREZ-LÓPEZ, C. y VÉLEZ.RUIZ, J.F. *Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad*. 2012.
 - 16) SWAISGOOD, Harold y OWEN, R. Fennema. *Características de la leche*. Química de los Alimentos. Segunda edición. Editorial ACRIBIA S.A. 2000.
 - 17) TETRA PAK PROCESSING SYSTEMS AB. *Manual de Industrias Lácteas*. S-221 86 Lund, Suecia. 1996.
 - 18) TROBERT JENNES, Pieterwalstra. *Química y física lactológica*. Editorial John Wiler and Sons. 1984

REVISTAS IMPRESAS:

- 19) *Lechería Argentina Anuario 2014*. Fundación PEL, Fundación para la Promoción y el Desarrollo de la Cadena Láctea Argentina. 2014.

ARTÍCULOS DE REVISTAS IMPRESAS:

20) AYALA-BRIBIESCA, E., DENISE CHABOT, M. L., TURGEON, S. L., BRITTEN, M. *Effect of calcium enrichment of Cheddar cheese on its structure, in vitro digestion and lipid bioaccessibility*. International Dairy Journal. 2016.

21) HASSAN, A., JOHNSON, M. E., LUCEY, J. A. *Changes in the Proportions of Soluble and Insoluble Calcium During the Ripening of Cheddar Cheese*. J. Dairy Sci. 87:854–862. 2004.

22) LUCEY, J. A., FOX, P. F.. *OUR INDUSTRY TODAY: Importance of Calcium and Phosphate in Cheese Manufacture: A Review*. Journal of Dairy Science Vol. 76, No.6. 1993.

23) LUO, J., PAN, T., GUO, H. Y., REN, F. Z. *Effect of calcium in brine on salt diffusion and water distribution of Mozzarella cheese during brining*. J. Dairy Sci. 96 :824–831. 2013.

24) MEINARDI, C.; ALONSO, A. ;HYNES, E. ; ZALAZAR, C. *Influence of milk-clotting enzyme on acidification rate of natural whey starters*. International Journal of Dairy Technology, 55, (3), 139-144. Editorial : Blackwell synergy. 2002.

25) UPRETI, P., MCKAY, L. L., METZGER, L. E. *Influence of Calcium and Phosphorus, Lactose, and Salt-to-Moisture Ratio on Cheddar Cheese Quality: Changes in Residual Sugars and Water-Soluble Organic Acids During Ripening*. J. Dairy Sci. 89:429–443. 2006.

26) ZALAZAR, C.; MEINARDI, C.; CANDIOTI, M.; BERNAL, S.; HYNES, E. *La maduración del queso cremoso Argentino*. Revista Argentina de Lactología 11, 59-72 . Editorial: Centro de publicaciones Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe (Argentina). 1995.

27) ZALAZAR, C.; MEINARDI, C.; HYNES, E. *Los quesos argentinos: Queso cremoso argentino. Una revisión general sobre su producción y característica*. (pp.20-49). Editorial: Centro de publicaciones Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe (Argentina). 1999.

ARTÍCULOS DE REVISTAS ELECTRÓNICAS:

28) BAIN, Ingrid. *Etapas del Proceso de Elaboración de quesos*. [en línea]. INTA EEA Chubut. [consulta 05 sep 2018].

<https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-etapas_del_proceso_de_elaboracin_de_queso_s.pdf>

29) CALVO REBOLLAR, Miguel. BIOQUÍMICA DE LOS ALIMENTOS. Proteínas del Lactosuero [en línea]. Universidad de Zaragoza. [consulta 05 sep 2018].

<<http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/proteins/lactosuero.html>>

30) SCHALLER, Aníbal. ALIMENTOS ARGENTINOS. Cadenas alimentarias. [en línea]. Dirección de Industria Alimentaria y Agroindustrias. [consulta 15 oct 2018].

<http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/revista/ediciones/46/cadenas/r46_06_Que_sos.pdf>

SITIOS WEB:

31) ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA [en línea]. actualizado al 03/2019. [consulta 09 abr. 2019].

<http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp>

32) LEY 18284 ‘CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO’. [en línea]. Actualizado al 03/2019. [consulta 09 abr. 2019].

<http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_VIII.pdf>

33) DATOS ABIERTOS GEOESPACIALES. Min. de Producción y Trabajo. [en línea]. [consulta 24 sep 2018].

<<https://geoadmin.agroindustria.gob.ar/geonetwork/srv/spa/catalog.search;jsessionid=5D5FCB8E94DCFA919BA5C8AA6C47271B.192.168.162.144#/map>>

34) DIRECCIÓN NACIONAL LÁCTEA [en línea]. actualizado al 03/2019. [consulta 20 abr. 2019].<https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss_lecheria/>

35) INFOSTAT SOFTWARE ESTADÍSTICO [en línea]. [consulta 26 abr. 2019]. <<http://www.infostat.com.ar>>

9 - ANEXOS

Anexo A:

Detalle de las muestras:

- Queso 1: Muestra Hansen Cremoso D+2, Tina 2, Elaboración 06/03/2018
- Queso 2: Muestra Hansen Cremoso D+2, Tina 2, Elaboración 06/03/2018
- Queso 3: Muestra Hansen Cremoso D+2, Tina 2, Elaboración 06/03/2018
- Queso 4: Muestra Hansen Cremoso D+2, Tina 2, Elaboración 06/03/2018
- Queso 5: Muestra Hansen Cremoso D+2, Tina 1, Elaboración 06/03/2018
- Queso 6: Muestra Hansen Q Cremoso - P. Buffer, Tina 2, Elaboración 19/04/2018
- Queso 7: Muestra Hansen Cremoso D+2, Tina 1, Elaboración 06/03/2018
- Queso 8: Muestra Hansen Q Cremoso - P.Buffer, Tina 1, Elaboración 19/04/2018
- Queso 9: Muestra Hansen Q Cremoso - P.Buffer, Tina 1, Elaboración 19/04/2018
- Queso 10: Muestra Hansen D+1, Tina 2, Elaboración 21/03/2018
- Queso 11: Muestra Hansen Q Cremoso - P.Buffer, Tina 2, Elaboración 19/04/2018
- Queso 12: Muestra Hansen D+1, Tina 1, Elaboración 21/03/2018
- Queso 13: Muestra Hansen Q Cremoso - P. Buffer, Tina 1, Elaboración 19/04/2018
- Queso 14: Muestra Hansen Q Cremoso - P. Buffer, Tina 1, Elaboración 19/04/2018
- Queso 15: Muestra Hansen Q Cremoso - P. Buffer, Tina 2, Elaboración 19/04/2018
- Queso 16: Muestra Hansen Cremoso D+2, Tina 1, Elaboración 06/03/2018
- Queso 17: Muestra Hansen Q Cremoso - P. Buffer, Tina 1, Elaboración 19/04/2018
- Queso 18: Muestra Hansen Q Cremoso - P. Buffer, Tina 2, Elaboración 19/04/2018

TABLA XVIII: Detalle de elaboración tinas del 19/04/18

Proyecto: Queso cremoso- Poder Buffer		
Objetivo: Elaboración de queso cremoso en tinas doble "O"		
4/19/2018		
Tina	1	2
Leche litros / toma de muestra para microb.	200	200
Leche día / proveedor	4/18/2018	4/18/2018
MG%		
Prot%		
MG%/Prot%	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
pH		
Inicio llenado	12:16	12:54
Calcio	320 ppm	320 ppm
Cultivo	STI-06	STI-06
Lote		
Dosis	165 g /5000 L	165 g /5000 L
Hora de agregado	12:36	13:04
Premaduración	30 min	41 min
Temperatura leche	35,8 °C	
pH	6,46	6,56
Acidez	14 °D	15 °D
Cuajo	CMM 200	CMM 200
Lote		
ph de coagulación	6,51	6,3
Acidez	15 °D	22 °D
Temp. Agregado de cuajo	38 °C	
Dosis	35 IMCU/L	31,5 IMCU/L
Hora de agregado	13:06	13:45

Hora de floculación	13:17	13:52
Factor de corte	2	2
Hora de corte*	13:28	13:57
Tiempo total de corte - min	6 min	6 min
Suero de corte		
Acidez	10 °D	14 °D
pH	6,5	6,24
Agitación: hora/pH	12 rpm / 720 seg	12 rpm / 720 seg
Agitación: hora/pH	14 rpm / 1800 seg	14 rpm / 3000 seg
Suero bajada		
GB		
Proteínas		
Acidez	11 °D	16 °D
pH	6,49	6,12
Hora de inicio / hora de fin	/ 14:23	15:06 / 15:10
Cuajada		
Hora	14:26	
Temperatura	37,2 °C	
pH	6,37	
Primer volteo		
Hora inicio / pH / temperatura	14:38 / 6,28 / 37,1 °C	15:25 / 5,98 / 37 °C
Hora fin / pH / temperatura	15:08 / 5,95	15:55
Segundo volteo		
Hora inicio / pH / temperatura	15:23 / 5,75 / 34,8 °C	16:10 / 5,53
Hora fin / pH / temperatura	16:08 / 5,37 / 36,2	16:40

	°C	
Hora entrada a salmuera / pH / temperatura	16:28 / 5,31 / 36,6 °C	16:40 / 5,31 / 35,8 °C
Milk Microbiology		
Raw Milk (PCA)	4,10E+05	4,70E+05
Coliform Lpast. (NMP/100 ml)	< 3 NMP / 100 ml	-
Coliform Lpast. (Fin llenado de tina) (NMP/100 ml)	< 3 NMP / 100 ml	< 3 NMP / 100 ml
Whey Microbiology		
Coliform count (Suero de Corte) ABRV (u.f.c./ml)	< 1 ufc / ml	< 1 ufc / ml
Coliform count (Suero Bajada) ABRV (u.f.c./ml)	< 1 ufc / ml	< 1 ufc / ml

Fuente: Resultados de la planta piloto de Chr-Hansen.

Anexo B:

Extracto de tesis “*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*” (María del Carmen, Pedro. 2012).(9).

1.1-Tratamiento de la muestra para la determinación de calcio y fósforo totales.

El tratamiento de la muestra fue realizado según la AOAC Official Method Analysis 994.25 (1995) (2). Una vez pesada la cantidad necesaria, se colocó en un crisol de porcelana, se introdujo en mufla a 100° C durante una hora y luego se fue subiendo gradualmente la temperatura hasta llegar a los 525° 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.

1.2-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 1.1, 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 (1), (11). 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. (12).
 - Determinación por Absorción Atómica: AOAC Official Method 99125 (3): se llevó a cabo utilizando un espectrómetro de absorción y emisión atómica de llama Perkin Elmer modelo 3110.

Se realizó una curva de calibración con soluciones estándar de 0 mg/L a 7 mg/L a partir de una solución madre de 1000 mg/L de calcio. Para analizar las muestras se realizaron las diluciones necesarias a partir de la solución preparada en 1.1 utilizando como diluyente una solución de LaCl_3 para eliminar interferencias.

1.3-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.

2- Resultados y discusión

2.1- Determinaciones realizadas en quesos comerciales

2.1.1- 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 1.1. 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 XIX:

Tabla XIX: Preselección del método para la determinación de calcio

Queso	Concentración de calcio en mg Ca/ 100 g de muestra				
	Volumétrico con EDTA		Volumétrico con $KMnO_4$	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

2.1.2- 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 XX:

Tabla XX: Determinación de Ca por los dos métodos a seleccionar sobre muestra de quesos comerciales.

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

TABLA XXI: 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) $\mu_1 = \mu_2$

H1) $\mu_1 \neq \mu_2$

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 crítico, se acepta la hipótesis nula Ho, entonces no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias obtenidas por los dos métodos analíticos.

Anexo C:

Curva de calibración para la determinación de calcio por espectrometría de absorción atómica:

Desde un patrón de Calcio 1000 ppm disuelto en ácido nítrico (HNO_3), se tomaron fracciones para lograr cinco puntos (0.8, 2, 4, 6 y 8 ppm de calcio) y de esta manera se realizó una curva de calibración con un coeficiente de correlación mayor a 0,999 (Fig. 26).

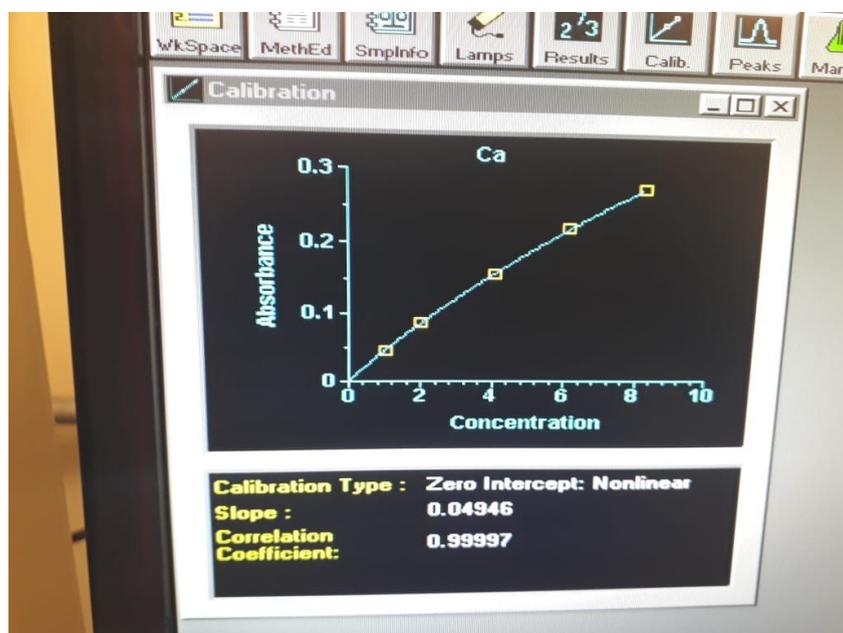


Figura 26: Curva de calibración para la determinación de calcio por espectrometría de absorción atómica.

Anexo D:

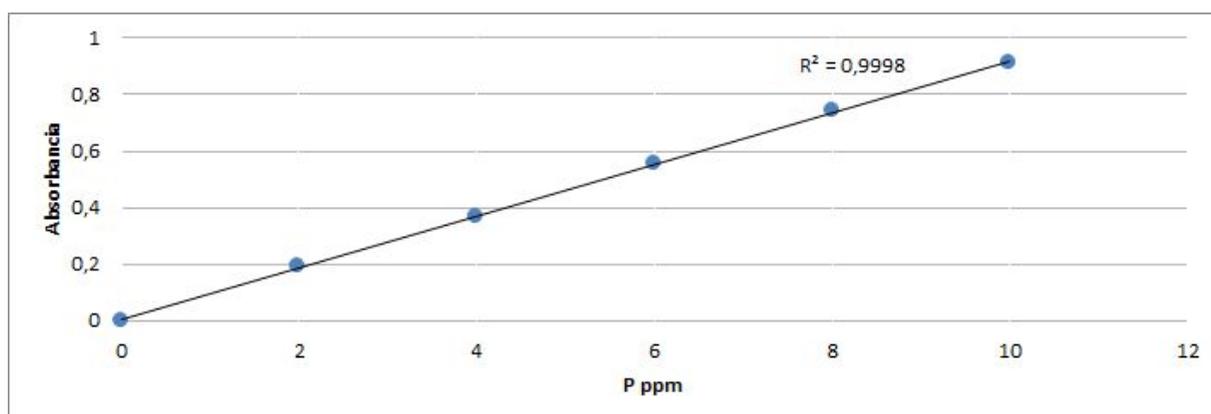
Curva de calibración para la determinación de fósforo por espectrofotometría UV - VISIBLE:

Desde un patrón sólido de KH_2PO_4 (previamente secado en estufa a 105°C) se tomaron fracciones para lograr cinco puntos (2, 4, 6, 8 y 10 ppm de fósforo, ver Tabla XXII). A cada patrón se le agregó 10 ml de una solución de molibdovanadato (preparada a partir de una sal de molibdato y una sal de vanadato), se enrasó a 50 ml con agua destilada y se leyó la absorbancia a 400 nm., y de esta manera se realizó una curva de calibración con un coeficiente de correlación mayor a 0,999 (Grafico III).

TABLA XXII: Absorbancias de los puntos de la curva de calibración.

concentración (ppm)	Absorbancia	Absorbancia corregida (restando el blanco)
2	0,212	0,192
4	0,389	0,369
6	0,574	0,554
8	0,761	0,741
10	0,931	0,911

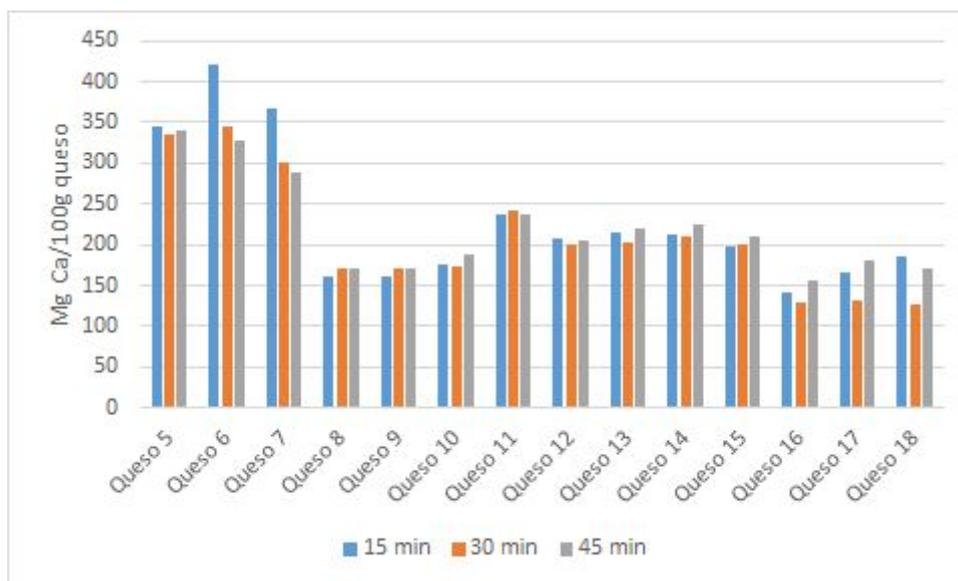
GRÁFICO III: Curva de calibración para la determinación de fósforo.



Anexo E:

Basándose en los resultados de Calcio Soluble extraído de los quesos a los 15 min, 30 min y 45 min de la tabla XV, se pudo generar el siguiente gráfico:

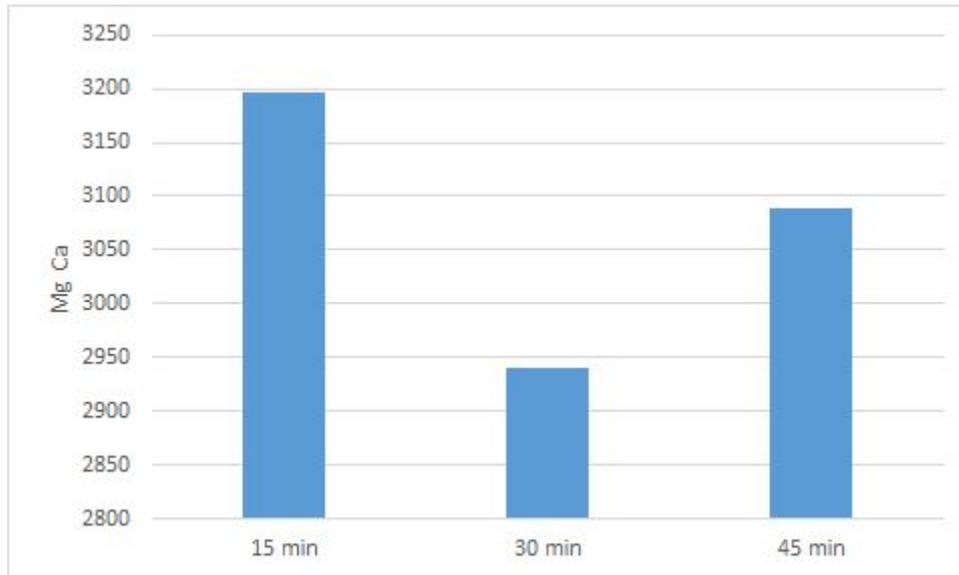
GRÁFICO IV: Concentración de Ca soluble durante las extracciones.



No se observó una tendencia definida pero se repitió el patrón de ser siempre la extracción de los 30 min menor o igual a las demás.

Por lo que realizando la sumatoria de todas las extracciones al mismo tiempo se pudo observar la siguiente tendencia (Gráfico V):

GRÁFICO V: Sumatoria del Ca soluble extraído en todos los quesos



En este último se observó como la cantidad de calcio soluble obtenida a los 30 min es considerablemente menor que las obtenidas a los 15 min y 45 min, dando así una tendencia de parábola positiva.

Anexo F:

Se realizó un análisis de la varianza (ANAVA), a través del programa estadístico InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba, Versión 2018).(35). Teniendo en cuenta las variables *fecha de elaboración*, *pH* y *Calcio soluble* de los quesos (ver Tabla XXIV):

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CALCIO SOL	14	0,28	0,07	31,35

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	18831,01	3	6277,00	1,32	0,3207
PH	690,38	1	690,38	0,15	0,7108
FECHA	18140,63	2	9070,32	1,91	0,1979
Error	47414,85	10	4741,49		
Total	66245,86	13			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=85,57703

Error: 4741,4851 gl: 10

PH	Medias	n	E.E.
6,50	201,32	9	25,89 A
6,24	211,38	5	34,78 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Los valores obtenidos revelaron que los resultados no presentaron diferencias significativas en el contenido de calcio soluble independientemente del PH o de la fecha de elaboración, asegurando que el método utilizado es repetible.

Esto se puede observar dado que el $p > 0,05$ en ambos casos y las medias no son significativamente diferentes (letra en común, $p > 0,05$).

Anexo G:

Se analizó la relación calcio total/fósforo total en los quesos, y los resultados fueron los siguientes:

TABLA XXIII: Relación calcio total y fósforo total.

	Ca (mg Ca/100g queso)	P (mg P/100g queso)	Ca/P
QUESO 1	1007	779,1	1,2925
QUESO 2	1003,6	780,6	1,2856
QUESO 3	878,6	686,5	1,2798
QUESO 4	800	679,4	1,1775
QUESO 5	1089,8	851,4	1,2800
QUESO 6	952,5	710,9	1,3398
QUESO 7	1002,4	780,5	1,2843
QUESO 8	613,4	473,8	1,2946
QUESO 9	628,1	513,7	1,2226
QUESO 10	577,5	451,2	1,2799
QUESO 11	586	361	1,6232
QUESO 12	632,2	412,8	1,5314
QUESO 13	667,7	467,6	1,4279

QUESO 14	655,7	441,6	1,4848
QUESO 15	564,9	418,5	1,3498
QUESO 16	503,7	395	1,2751
QUESO 17	572,9	428,9	1,3357
QUESO 18	497,3	380,1	1,3083
			PROM.
			1,3374

GRÁFICO VI: Cantidades de Ca total y P total en los quesos.



GRÁFICO VII: Relación Ca total/P total en los quesos.



Analizando los datos anteriores se pudo observar que la relación Ca total/P total fue la esperada para quesos blandos según las fuentes bibliográficas, con un promedio de 1,34.

Anexo H:

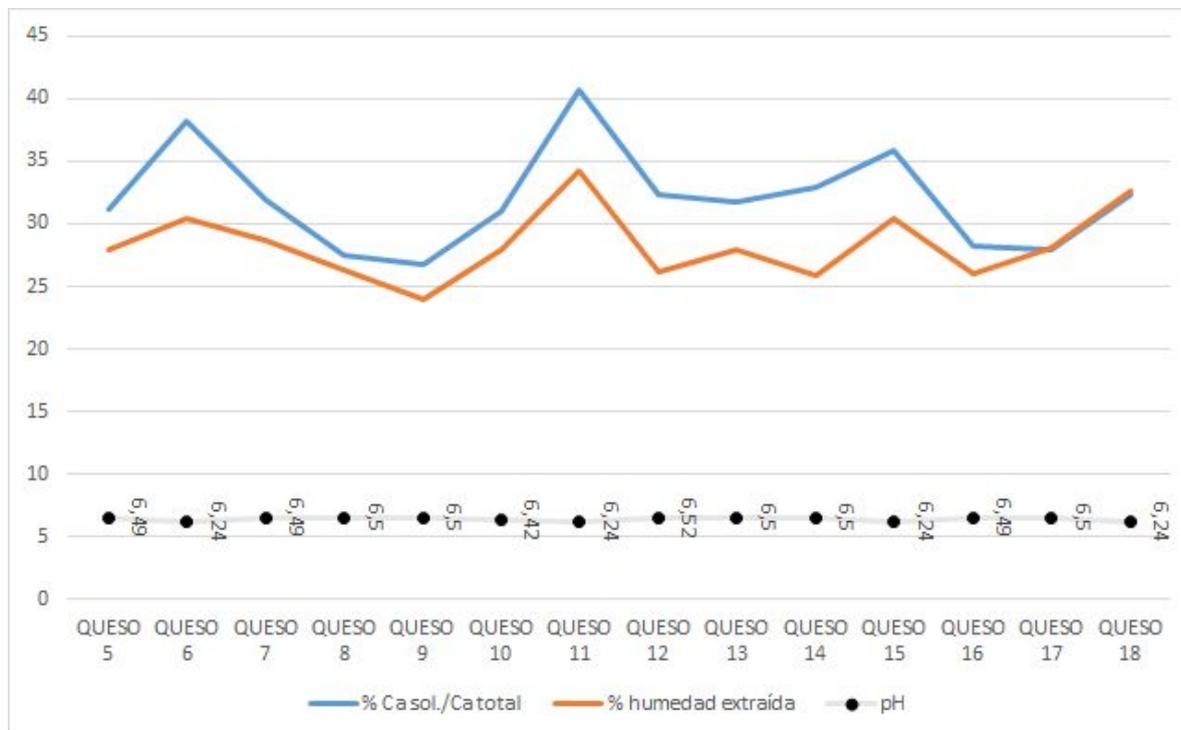
El objetivo de este anexo es relacionar los porcentajes de Ca soluble y humedad extraída con el ph de las tinas.

TABLA XXIV: Relación % calcio soluble/calcio total, % humedad extraída y pH.

	Ca total (mg Ca/100g queso)	Ca soluble (mg Ca/100g queso)	% ca soluble/ca total	% humedad extraída (%v/m)	pH (suero de corte)
QUESO 1	1007	0	0	0	6,48
QUESO 2	1003,6	0	0	0	6,48
QUESO 3	878,6	0	0	0	6,48
QUESO 4	800	0	0	0	6,48
QUESO 5	1089,8	339,8	31,1800	28	6,49
QUESO 6	952,5	364,3	38,2467	30,4	6,24
QUESO 7	1002,4	319,4	31,8635	28,7	6,49
QUESO 8	613,4	168,3	27,4372	26,3	6,5
QUESO 9	628,1	168,2	26,7791	24	6,5
QUESO 10	577,5	179,1	31,0129	27,9	6,42
QUESO 11	586	238,5	40,6996	34,3	6,24
QUESO 12	632,2	204,4	32,3315	26,2	6,52

QUESO 13	667,7	212,3	31,7957	27,9	6,5
QUESO 14	655,7	215,7	32,8961	25,9	6,5
QUESO 15	564,9	202,8	35,9001	30,4	6,24
QUESO 16	503,7	141,9	28,1715	26	6,49
QUESO 17	572,9	160	27,9280	28,1	6,5
QUESO 18	497,3	160,8	32,3346	32,6	6,24
			PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO
			32,0412	28,33	6,42

GRÁFICO VIII: Relación % calcio soluble/calcio total, % humedad extraída y pH.



Se pudo observar que hay una tendencia de aumentar los porcentajes de calcio soluble y de cantidad de humedad extraída, al disminuir el pH del queso.