



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Facultad de Ciencias Agrarias

Escuela de Ingeniería en Alimentos

Estudio de parámetros Microbiológicos que afectan la calidad del Queso tipo Gouda

Tesis de grado presentada como
requisito para optar al grado de
Licenciado en Ingeniería en
Alimentos

Lorena Luz Fuentes Mora

Valdivia Chile 2003

Profesor patrocinante

Renate Schöbitz Twele

Tecnólogo Medico, M. Sc.

Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentos

Facultad de Ciencias Agrarias

Profesores informantes

Luz Haydée Molina Carrasco

Profesora de Biología y Química

Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentos

Facultad de Ciencias Agrarias

Carmen Brito Contreras

Ingeniero en Alimentos, M. Sc.

Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentos

Facultad de Ciencias Agrarias

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres Rosa y Waldemar y a mis hermanos Patricio, Ana, y en especial a Nancy, por apoyarme y confiar en mi.
- A Andrés, por su gran apoyo y compañía en todos los momentos de este ciclo de mi vida.
- A mi profesora Patrocinante de Tesis Sra Renate Schöbitz y a la profesora Sra Luz H. Molina, por su constante colaboración y consejos prestados durante esta investigación.
- Se agradece en forma especial, a la empresa de la Décima Región por la financiación de este estudio y por la oportunidad que me brindaron de crecer profesionalmente.
- A la Sra Mariella Horzella, por su colaboración y disponibilidad de tiempo en el Laboratorio de Microbiología del ICYTAL.
- A mis amigas María Elena y Mirtza, por su amistad, compañía, alegrías y apoyo durante estos años de Universidad.
- A mi fiel amigo, que me acompaña desde el cielo.....

*A mis padres
Waldemar y Rosa
por su esfuerzo y dedicación*

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Características del queso Gouda	3
2.2	Factores que influyen en la calidad microbiologica del queso	6
2.2.1	Calidad microbiologica de la leche	6
2.2.2	Presencia de inhibidores	9
2.2.3	Cultivos lácticos	10
2.2.4	Calidad del agua utilizada durante el proceso	10
2.2.5	Estado de contaminación del aire	11
2.2.6	Manipuladores de alimentos	12
2.2.7	Higiene en la superficie de los equipos	12
2.2.8	Higiene en la planta lechera	14
2.3	Sobrevivencia y crecimiento de los microorganismos en quesos	15
2.4	Problemas tecnológicos de origen microbiano más frecuentes en quesos	17
2.4.1	Hinchazón temprana	17
2.4.2	Hinchazón tardía	18
3	MATERIAL Y MÉTODO	21
3.1	Lugar del estudio	21
3.2	Descripción de los puntos de muestreo en la línea de proceso de elaboración del queso tipo Gouda	21

3.3	Plan de toma de muestra	22
3.3.1	Leche pasteurizada	22
3.3.2	Manos de manipuladores	22
3.3.3	Superficies de moldes	22
3.3.4	Superficies de tina de pre prensado	23
3.3.5	Ambiente	23
3.3.6	Muestra de agua	23
3.3.7	Muestra de queso	23
3.4	Metodología de análisis	24
3.4.1	Preparación de las muestras para su análisis	24
3.4.2	Análisis de leche pasteurizada a tina llena	24
3.4.2.1	Recuento de enterobacterias	24
3.4.2.2	Presencia de <i>Escherichia coli</i>	25
3.4.2.3	Presencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	25
3.4.2.4	Recuento total de bacterias mesófilas	25
3.4.2.5	Número más probable (N.M.P) de bacterias anaerobias esporulados	25
3.4.3	Control microbiológico de manipuladores	26
3.4.3.1	Presencia de <i>S. aureus</i>	26
3.4.3.2	Presencia de enterobacterias	26
3.4.4	Control microbiológico de superficies de tina de pre prensado	26
3.4.4.1	Recuento total de bacterias mesófilas	26
3.4.4.2	Recuento de enterobacterias	27
3.4.5	Control microbiológico de moldes	27
3.4.5.1	Recuento total de bacterias mesófilas	27
3.4.5.2	Recuento de enterobacterias	27
3.4.6	Control de ambiente	27
3.4.7	Análisis de agua	27
3.4.8	Análisis microbiológico de queso a la salida de prensa	27
3.4.9	Análisis de muestras de queso al día cero y a los 28 días de	

	maduración	28
3.4.10	Determinación de pH	28
3.4.11	Determinación de cloro residual	28
3.5	Análisis de resultados	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Recuento de bacterias mesófilas y enterobacterias en leche pasteurizada a tina llena	31
4.2	Análisis microbiológicos de los quesos a la salida de prensa, al día cero y con 28 días de maduración	33
4.3	Control microbiológico de manipuladores	35
4.4	Control microbiológico de moldes	36
4.5	Control microbiológico en diferentes superficies de la tina de pre prensado	37
4.6	Control de ambiente	38
4.7	Número Más Probable (N.M.P.) de bacterias anaerobias esporuladas presente en la línea de producción de queso tipo Gouda	40
4.8	Presencia de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> en diferentes puntos de la línea de producción del queso tipo Gouda	40
4.9	Control del agua utilizada en la planta	42
4.10	Valores de pH durante la elaboración del queso tipo Gouda	43
4.11	Temperaturas y humedad determinados en distintas áreas de la planta de proceso	44
5	DISCUSIÓN	45
6	CONCLUSIONES	53
7	RESUMEN - SUMMARY	54
8	BIBLIOGRAFÍA	56
9	ANEXOS	66

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Variación de pH durante el proceso de elaboración de queso tipo Gouda	4
2	Composición físico química del queso Gouda madurado	6
3	Criterios de clasificación de leche cruda según su contenido de esporas/l	8
4	Criterios de clasificación de ensilados, según su contenido de endosporas/g	9
5	Clasificación para el recuento microbiano del aire de diversas áreas de procesado	12
6	Grado de limpieza, según presencia de microorganismos en las superficies limpias de equipos de procesos lácteos	13
7	Clasificación del estado higiénico de superficies, muestreadas por el método de la tórula	14
8	Puntos muestreados en la línea de proceso de queso tipo Gouda con su respectivo número de muestras	21
9	Análisis realizados en los distintos puntos de la línea de elaboración de queso tipo Gouda	29
10	N.M.P de coliformes totales y fecales en el agua para el lavado de equipos	42
11	Contenido de cloro residual en distintos puntos de la sala de proceso	43

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fuentes de contaminación del producto proveniente desde el interior ó exterior de la planta procesadora de alimentos	15
2	Recuentos de bacterias mesófilas y enterobacterias en leche pasteurizada a tina llena	31
3	Recuentos de bacterias mesófilas en leche pasteurizada y su relación con valores de referencia (M y m) del R.S.A (CHILE, 2000)	32
4	Recuentos de enterobacterias en queso tipo Gouda entre fechas de elaboración	33
5	Recuentos de enterobacterias en el queso con 28 días de maduración y su relación con valores de referencia (M y m) según el R.S.A (CHILE, 2000)	35
6	Presencia de <i>S. aureus</i> , enterobacterias y <i>E. coli</i> en manos de manipuladores	36
7	Recuentos enterobacterias y bacterias mesófilas en superficies de moldes de quesos	36
8	Recuentos de bacterias mesófilas y enterobacterias en superficies del fondo de la tina de pre prensado (técnica con tórula)	37
9	Recuento de bacterias mesófilas en superficies de los costados de la tina de pre prensado (placa RODAC)	38
10	Recuentos de bacterias mesófilas, mohos y levaduras en el ambiente de distintos sectores de la sala de proceso	39
11	N. M.P de bacterias anaerobias esporuladas durante la elaboración del queso tipo Gouda (se presentan los resultados	

	de las 5 muestras de la primera fecha de elaboración)	40
12	Presencia de <i>E. coli</i> en distintos puntos de la línea de producción del queso tipo Gouda	41
13	Presencia de <i>S. aureus</i> en distintos puntos de la línea de elaboración de queso tipo Gouda	42
14	Valores de pH de leche y queso por fecha de elaboración en diferentes puntos de la línea de producción	44

INDICE DE ANEXOS

Anexos		Página
1	Diagrama de flujo de queso tipo Gouda de la planta	67
2	Leche pasteurizada a tina llena	69
2.1	Análisis microbiológico por fecha de muestreo	69
2.2	Resultados de análisis estadísticos del recuento de bacterias mesófilas por fecha de elaboración, en muestras de leche pasteurizada a tina llena	70
2.3	Resultados de análisis estadísticos del recuento de entero bacterias por fecha de elaboración, en muestras de leche pasteurizada a tina llena	70
3	Queso salida de prensa	71
3.1	Análisis microbiológico por fecha de muestreo	71
3.2	Análisis estadísticos por fecha de muestreo en muestras de queso a la salida de prensa	72
4	Queso con cero días de maduración	74
4.1	Análisis microbiológico por fecha de muestreo	74
4.2	Análisis estadístico por fecha de muestreo, en muestras de queso con 0 días de maduración	75
5	Queso con 28 días de maduración	77
5.1	Análisis microbiológico por fecha de muestreo	77
5.2	Análisis estadístico por fecha de muestreo, en muestras de queso con 28 días de maduración	78
6	Análisis estadísticos de recuentos de enterobacterias en queso a la salida prensa, día cero y 28 días de maduración, para una misma fecha de elaboración	80

6.1	Quesos de la primera fecha de elaboración	80
6.2	Quesos de la segunda fecha de elaboración	80
6.3	Quesos de la tercera fecha de elaboración	81
6.4	Quesos de la cuarta fecha de elaboración	81
6.5	Quesos de la quinta fecha de elaboración	82
7	Resultados del control microbiológico en las manos de los Manipuladores	84
8	Resultados de control microbiológico en moldes	85
9	Tina de pre prensado	86
9.1	Control microbiológico por fecha de muestreo	86
9.2	Análisis estadísticos por fecha de elaboración en superficies del fondo de la tina para el recuento de bacterias mesófilas	87
9.3	Resultados de análisis estadísticos por fecha de elaboración en superficies del fondo de la tina para el recuento de enterobacterias	87
9.4	Análisis estadísticos por fecha de elaboración en superficies de los costados de la tina para el recuento de bacterias mesófilas	88
10	Control microbiológico de ambiente (ufc/15 minutos de exposición)	90
11	Resultados de la determinación de pH en leche y queso	91
12	Temperaturas y humedad por fecha de muestreo determinadas en diferentes secciones de la planta	92

1. INTRODUCCIÓN

La necesidad de obtener una leche que reúna las condiciones higiénicas adecuadas para la elaboración de productos lácteos como el queso, ha llevado a que exista gran preocupación por el control de los microorganismos presentes en ella.

En la elaboración del queso es importante tener en cuenta no sólo sus características nutritivas, sino también la calidad microbiológica de su materia prima. Deficiencias higiénicas durante su procesamiento, pueden dar origen a un producto que contenga microorganismos que afecten la calidad del producto final o sean patógenos para el consumidor.

Es por ello, que se deben realizar controles microbiológicos rigurosos y periódicos en la línea de elaboración de este producto, para identificar sus posibles fuentes de contaminación, tales como: superficies de trabajo, equipos, agua, aire, manipuladores, utensilios, etc. Todos estos potenciales puntos de contaminación pueden causar diferentes defectos en el queso. Es por ello, que se hace necesario buscar soluciones a estos problemas, a través de la educación y supervisión del correcto desempeño por parte de todas las personas que se encuentran involucradas en la línea de elaboración del queso.

En relación a lo señalado anteriormente, para este trabajo se planteó la siguiente hipótesis de trabajo:

“ La calidad microbiológica final del queso tipo Gouda, se ve afectada por contaminaciones microbiológicas que ocurren durante su elaboración. “

Esta hipótesis originó los siguientes objetivos generales y específicos de la presente investigación.

Objetivo general:

- Establecer los puntos de contaminación, durante el proceso de elaboración de queso tipo Gouda, que inciden sobre la calidad microbiológica del producto terminado.

Objetivos específicos:

- Identificar los puntos de mayor riesgo de contaminación microbiológica durante el proceso de elaboración de queso tipo Gouda.
- Determinar la calidad microbiológica del producto terminado a través del recuento de enterobacterias, N.M.P de bacterias esporuladas y la detección de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
- Determinar la variación en los recuentos de la flora microbiana contaminante de queso tipo Gouda entre el tiempo cero y los 28 días de maduración.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El queso puede ser definido como un producto de la concentración de los sólidos de la leche, por medio de la coagulación (FAO, 1983). En general, la producción de quesos, involucra dos fases, primero el desarrollo de un pH adecuado y posteriormente el desarrollo de características físicas y organolépticas deseables (ELMER y JAMES, 1998). Además, se pueden distinguir tres principios fundamentales en la producción de quesos. El primero, es la “concentración” de la leche que ocurre por la formación de la cuajada, ya sea por el desarrollo de bacterias productoras de ácido o por el cuajo. En esta etapa el suero es separado de la cuajada por medio de una división mecánica, por desarrollo de ácido, agitación, elevación de temperatura y prensado. El segundo principio es la “conservación” del queso, lo cual se logra mediante una buena higiene, pasteurización, concentración, acidificación, salado, adición de nitrato, y enfriamiento. Por último, la “maduración”, durante la cual ocurre una transformación de los sólidos del queso, por lo cual aparecen las características del sabor, consistencia y apariencia dependiendo de la variedad del queso (FAO, 1983).

Según MAHECHA, (1987), una de las clasificaciones más ampliamente conocidas para los quesos, es la que tiene como referencia su consistencia, la que depende a su vez, del contenido de humedad y de materia grasa, así como de su grado de maduración. Según su consistencia, los quesos pueden agruparse en cinco categorías: blandos, semiblandos, semiduros, duros y extraduros.

2.1 Características del queso Gouda

Dentro de los quesos semiduros, se encuentra el queso Gouda, que se originó en Holanda, y se describe como un queso de corteza fina, seca, suave, y de cuajada lavada, con una textura firme que puede ser cortado fácilmente. Además posee ojos redondos u ovals con una masa de color blanco marfil o amarillento, y de sabor suave (SCOTT,

1991; MADRID, 1990; CODEX ALIMENTARIUS, 2000). De acuerdo a la Norma Chilena para queso Gouda, NCh N° 2478 (CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN, INN, 1999), su maduración se produce en un envase de material retráctil, durante un mínimo de 15 días, en condiciones controladas.

FAO (1983), señala que en la elaboración del queso tipo Gouda, se utilizan cultivos mesófilos mixto que contiene cuatro especies de microorganismos que son: *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus diacetylactis* y *Leuconostoc cremoris*. Los cultivos mixtos otorgan un aroma y sabor delicados y altamente deseables a los productos fermentados. Además, estas especies aromatizantes son las que gobiernan la producción de CO₂, siendo responsables de la formación de ojos. *L. lactis* y *L. cremoris*, utilizan la lactosa como fuente de energía, produciendo a partir de ésta entre 0,8 a 1,0% de ácido, del cual la mayor parte es ácido láctico, y trazas de ácido acético y propiónico (homofermentativo). En cambio, *L. diacetylactis*, es capaz de fermentar los citratos con la producción de CO₂, acetoína y diacetilo. *L. cremoris* fermenta los citratos en presencia de otra fuente hidrocarbonada, (por ejemplo, lactosa), produciendo CO₂, piruvatos, y acetatos (FAO, 1981).

El queso experimenta diversos cambios, desde su prensado hasta su maduración, los cuales incluyen la fermentación de la lactosa y posterior degradación de los lactatos, proteólisis, lipólisis y degradación de los ácidos grasos, además de reacciones de óxido reducción y modificación del pH (BRITO, 1993). En relación al pH, en el CUADRO 1 se presentan las variaciones de pH que experimentó el queso Gouda durante las distintas etapas de su fabricación, en un estudio realizado por NIKLITSCHK (1997).

CUADRO 1 Variación de pH durante el proceso de elaboración de queso tipo Gouda.

ETAPA	pH (promedio)
Inicio pre maduración	6,49
Salida de prensa	5,74
Entrada salmuera	5,38
Inicio maduración	5,22
Final maduración	5,33

FUENTE: NIKLITSCHK (1997).

El pH es consecuencia de las reacciones químicas y bioquímicas que experimenta el queso en el proceso de su elaboración (BOURGEOIS *et al.*, 1994). Los valores de pH se asocian a la acción de los microorganismos sobre la lactosa y a la posterior acción proteolítica que se manifiesta por el aumento de la capacidad buffer de la cuajada (DURAN, 1985). SCOTT (1991), señala que las primeras operaciones de la elaboración del queso hasta el momento de la salazón determinan el grado de acidificación de la cuajada debido a la degradación de la lactosa, lo que determina el valor de pH del queso fresco. A partir de este momento la actividad de las bacterias degradan otros componentes de la cuajada donde se liberan sustancias neutras o alcalinas que elevan el pH.

Un aumento del pH produce un incremento de la actividad proteolítica, a consecuencia del aumento de la actividad de los microorganismos y enzimas, en cambio, a valores bajos de pH (<5,0), disminuye considerablemente la velocidad de degradación de estos componentes, por lo cual, a valores mayores de pH se requiere un menor tiempo de maduración a diferencia, de valores más bajos de éste (BRITO *et al.*, 1995).

La humedad es un parámetro muy importante en el proceso de la maduración del queso, ya que controla el crecimiento y la actividad de los microorganismos (SCOTT, 1991). La humedad durante el proceso de maduración del queso constituye un factor fundamental, ya que influye en forma considerable en los procesos degradativos del producto, favoreciendo la solubilidad y difusión de enzimas y de productos de la degradación de los procesos bioquímicos ocurridos durante la maduración (ALAIS, 1985).

Por otro lado, la sal tiene como función causar un descenso de la actividad de agua lo que constituye un factor limitante y selectivo del crecimiento de los microorganismos. Además, limita el descenso de la temperatura que sufre el queso durante el salado donde es sometido a temperaturas entre 10 a 15°C, lo que disminuye la velocidad de crecimiento tanto para los cultivos lácticos, como para la flora contaminante (MENDEZ, 1987).

En el CUADRO 2 se presenta la composición físico química del queso Gouda madurado, de acuerdo a especificaciones señaladas en la Norma Chilena de queso Gouda (CHILE, 1999).

CUADRO 2 Composición físico química del queso Gouda madurado

PARAMETROS	VALOR
Humedad (%)	46 – 48
Materia Seca (%)	52 – 54
Materia grasa en extracto seco (%)	45 – 59,9
Nitrato de sodio o potasio (mg/Kg de queso)	25
pH	5,1 - 5,3
Fosfatasa	Negativa

FUENTE: CHILE (1999)

2.2 Factores que influyen en la calidad microbiológica del queso

2.2.1 Calidad microbiológica de la leche. COSENTINO y PALMAS (1997), indican que la producción de alimentos de alta calidad microbiológica, es estrictamente dependiente de la calidad microbiológica de la materia prima, siendo además necesaria una optimización de los parámetros del tratamiento térmico. SPAHR y URL (1994), señalan que a la leche se le debe aplicar un tratamiento térmico de 72°C por 15 segundos para asegurar una completa eliminación de los microorganismos patógenos. Según MADRID *et al.* (1990), con la pasteurización se logra una reducción en el número de microorganismos en la leche del 92 al 98%. Esto se vio reflejado en un estudio realizado por UR - REHMAN *et al.* (1999), quienes observaron que la leche utilizada para la elaboración de quesos contenía 22 ufc/ml de coliformes y $3,5 \times 10^3$ ufc/ml de recuento total de bacterias y después de la pasteurización los recuentos fueron reducidos a < 1 ufc/ml y $5,1 \times 10^2$ ufc/ml respectivamente. Por lo tanto, el número inicial de gérmenes presentes en la leche, condiciona la respuesta de los microorganismos a los diferentes tratamientos durante el procesamiento y por ende a la calidad final del producto (PELAEZ, 1985; EYLES, 1992). Por otro lado, la pasteurización no destruye las endosporas, pudiendo germinar éstas en la maduración del queso y producir sustancias dañinas, como el ácido butírico, que afecta el sabor del queso y gran cantidad de hidrógeno, que destruyen su textura. Estas esporas sólo se destruyen a temperaturas

superiores a 80°C, que sobrepasan la temperatura de pasteurización (MADRID **et al.**, 1990).

Al extender el tiempo de almacenamiento de la leche refrigerada, se favorece el crecimiento de bacterias psicrotróficas, las cuales producen enzimas extracelulares resistentes al calor, que degradan las proteínas y componentes grasos de la leche, afectando las propiedades de la leche para su procesamiento, y posteriormente la calidad de los quesos. Se ha encontrado además, una disminución en el rendimiento de los quesos, debido a la acción de las enzimas, lo que conlleva a pérdidas económicas en la industria quesera del orden de 1,4 a 4,2%. (CROMIE, 1992; CRAVEN, 1992). Law et al., citado por CROMIE (1992), detectaron sabores rancios y a jabón, en quesos almacenados, después de 2 a 4 meses, elaborados con leche pasteurizada con recuentos de $3,0 \times 10^7$ ufc/ml de bacterias psicrotróficas. La rancidez fue evidente en quesos con 6 meses de maduración elaborados con leche que fue almacenada a 5°C por 72 horas, teniendo un recuento de bacterias psicrotróficas de 10^6 ufc/ml. Para evitar estos problemas hay que practicar correctamente los procedimientos de higiene, en conjunto con la mantención de bajas temperaturas de almacenamiento igual o inferior a 4°C (CROMIE, 1992).

Otro problema de contaminación en leche son los microorganismos de origen fecal. Las buenas prácticas durante el ordeño son principales medidas de prevención que contribuyen a la obtención de leche de buena calidad higiénica. Estas bacterias de origen fecal son sensibles a los tratamientos térmicos como la pasteurización, siendo ésta una medida para reducir su número a niveles tales, que sea seguro para la salud. Sin embargo, la sobrevivencia y crecimiento de *Escherichia coli* O157: H7 durante la elaboración de productos lácteos y su presencia en productos terminados, se puede deber por ejemplo, a una contaminación post pasteurización. Para evitar estos peligros, los procedimientos de análisis de peligros y control de puntos críticos (HACCP), deben ser implementados en la línea de proceso para prevenir toda posible contaminación (BASTIAN y SIVELA, 2000).

MARTIN (1981), indica que las bacterias formadoras de esporas están presentes en la leche cruda, generalmente a niveles inferiores a 1000 ufc/ml. En el CUADRO 3, se presentan los criterios de clasificación de leche cruda según su contenido de esporas / l.

CUADRO 3 Criterios de clasificación de leche cruda según su contenido de esporas/l.

Contenido de esporas / litro de leche	Criterios
Menos de 400	Excelente
400 a 1.000	Poco contaminada
1.000 a 4.000	Contaminada
Más de 4.000	Mala

FUENTE: citado por Mathieu, extraído de CASADO y GARCIA, 1985

La contaminación de clostridios en leche en general es baja, excepto cuando las vacas han sido alimentadas con ensilaje, ya que los clostridios son originales del suelo y pueden multiplicarse en el ensilaje cuando la calidad de éste es deficiente (Eck, citado por URIBE, 2002).

Los pastos con los que se elaboran los silos, son un sustrato ideal para el crecimiento de clostridios bajo condiciones anaeróbicas. La tierra es el principal hábitat de los clostridios. Es por ello, que la presencia de esporas en el silo, puede ser efecto de una contaminación por el suelo (RAMMER, 1996).

Según STADHOUDERS y SPOELSTRA (1990), la baja actividad de agua (a_w) en el pasto inhibe las bacterias, particularmente los clostridios, por lo tanto es favorable usar en el ensilado pasto con bajo contenido de humedad. Los aditivos como el azúcar y bacterias lácticas, estimulan la fermentación ácido láctico inhibiendo los clostridios.

En el CUADRO 4 se presenta un criterio de clasificación de ensilados, según su contenido de esporas.

CUADRO 4 Criterios de clasificación de ensilados, según su contenido de endosporas/g

Contenido de esporas / g de ensilado	Criterios
Menos de 1.000	Bueno
1.000 a 10.000	Medio
Más de 10.000	Malo

FUENTE: citado por Mathieu, extraído de SUAREZ y COLOMO (1990).

CASADO Y GARCIA (1985), señalan que el contenido de esporas de clostridios en la leche depende de los cuidados en el ordeño y de la preparación de los animales, ya que llegan a la leche por medio de los residuos de ensilado transportados por el aire al animal o al pezón, y principalmente por las heces, que contaminan el exterior de la ubre y pasa en parte a la leche.

2.2.2 Presencia de inhibidores. ALAIS (1985), indica que los residuos de inhibidores que pueden corresponder a antibióticos, provienen del tratamiento de diferentes enfermedades del ganado, especialmente de mastitis. En este caso, los antibióticos se aplican directamente en la glándula mamaria. Es por ello que se debe respetar el tiempo de resguardo, tiempo en que la leche no es utilizada, ya que los residuos de antibióticos pueden ser eliminados por la leche. Ello, constituye un grave problema en la elaboración de los quesos, debido a su acción sobre los cultivos, siendo de especial peligro para los quesos de pasta cocida debido a la alta sensibilidad de los cultivos termófilos a los diferentes antibióticos DURAN (1985).

MADRID (1989), señala que al elaborar queso con leche que contiene antibióticos, las bacterias lácticas utilizadas en la maduración del queso son destruidas total o parcialmente. En consecuencia la acidez desarrollada en el queso no tiene lugar o se produce de una forma más débil, lo que lleva consigo a un menor desarrollo de los sabores y aromas típicos del queso. Además, los antibióticos afectan en forma distinta el desarrollo de diferentes especies bacterianas, donde las bacterias lácticas son más sensibles, mientras que los coliformes lo son en menor grado. Esto tiene como consecuencia un desarrollo mayor de los coliformes, con lo que se obtienen quesos de aromas y sabores anormales. En consecuencia la severidad de la inhibición de los

cultivos en la tina, determinará el grado del defecto en el producto (LIMSOWTIN, 1992).

El efecto de residuos de detergentes y desinfectantes sobre los cultivos utilizados en la elaboración de quesos, es similar en algún aspecto, al de los antibióticos. Se ha visto que dosis de 25 a 50 ppm de cloro activo, tiene un efecto inhibitor sobre las bacterias lácticas, lo que produce retraso en la acidificación del queso durante su proceso de maduración (MADRID, 1989).

2.2.3 Cultivos lácticos. Los cultivos lácticos tienen como función la fermentación de la lactosa con producción de ácido láctico como parte del proceso de maduración de los quesos (BRITO, 1982; BACHMANN y SPAHR, 1995). También controlan a los microorganismos patógenos presentes en la leche pasteurizada al haber un tratamiento térmico insuficiente o por una contaminación pos pasteurización. Tal control ocurre a través del predominio de los cultivos lácticos sobre otros microorganismos, debido a la competencia por nutrientes. Además, el desarrollo de la acidez durante el proceso, es también una condición desfavorable para el desarrollo de los microorganismos patógenos. GAYA **et al.** (1986), estudiaron el efecto de los cultivos lácticos en quesos Manchego con 60 días de maduración, elaborados con leche cruda de oveja. Los recuentos de enterobacterias en los quesos con adición de cultivos fueron de $6,7 \times 10^1$ ufc/g y de $6,0 \times 10^3$ ufc/g sin la adición de éstos. PASCUAL (1983); BACHMANN y SPAHR (1995), señalan que hay que asegurar al máximo las condiciones de asepsia y preparación del cultivo madre inicial, ya que el medio de cultivo es idóneo para el desarrollo de cualquier bacteria. Los problemas de contaminación son muy frecuentes, cuando no se trabaja con las adecuadas precauciones higiénicas (PASCUAL, 1983).

2.2.4 Calidad del agua utilizada durante el proceso. El agua utilizada para el lavado de superficies que tendrán contacto con los alimentos, debe ser potable y tener una concentración de 1 a 2 ppm de cloro libre residual (IDF/FIL, 1994). Estos valores concuerdan con un estudio realizado por ZHAO **et al.** (2001), quienes encontraron que *E. coli* fue sensible a concentraciones de 1,1 ppm de cloro libre.

Según la normativa chilena (CHILE, INN, 1984), el agua potable debe estar exenta de microorganismos de origen fecal, determinado por la presencia de gérmenes del grupo coliformes. La Organización Mundial de la Salud (O.M.S., 1964), señala que ninguna muestra de agua debe tener un número más probable (NMP) de bacterias coliformes, superior a 10 por 100 ml de agua; ni tampoco tolerar un índice NMP entre 8 y 10 coliformes en más de dos muestras consecutivas.

AGÜERO *et al.* (1987), indican que la existencia de un alto recuento de bacterias totales y coliformes en agua, disminuyen la eficiencia de los procesos de higienización y contribuyen a elevar el contenido microbiano de la leche. Además, al ocurrir una contaminación fecal del agua, ello implica riesgo de presencia de patógenos, ya que éstos pueden multiplicarse, ya sea en la leche o en la superficie de equipos o estanques mal lavados (HEIMLICH y CARRILLO, 1995). También, COSENTINO y PALMAS (1997), señalan que la calidad del agua, es la que define la calidad de la limpieza de los equipos. Por otro lado, el agua es una importante fuente de microorganismos psicrotróficos, que al contaminar la leche pueden causar problemas tecnológicos debido fundamentalmente a la acción de sus enzimas proteolíticas y lipolíticas termoestables, que pueden producir alteraciones en el sabor y olor de la leche y productos lácteos (COUSIN, 1982).

2.2.5 Estado de contaminación del aire. Según IDF/FIL (1997), la contaminación del aire también es un factor que afecta la calidad del producto, y se puede presentar por una variedad de fuentes, como es el personal, ya sea por un excesivo tráfico de operarios en las diferentes áreas de procesos, a través de zapatos, vestuario e higiene personal. Otra fuente de contaminación del aire puede ocurrir en la sala de proceso por una mala mantención de la planta, ya sea por paredes y suelo sucios o por gotas del condensado que pueden caer de algunas cañerías o del techo.

ROBINSON (1987), indica que la principal fuente de contaminación del aire son los operarios y materiales de empaque, y para proteger el producto de una contaminación microbiana, es esencial implementar mecanismos de ventilación y filtración de aire,

principalmente en plantas pequeñas. De esta forma se elimina la humedad liberada durante el proceso y se previene la condensación y enmohecimiento subsiguiente de la superficie de las paredes. Indica también, que la humedad de las dependencias de procesado no debe superar el 95% de humedad relativa. Este autor propone una clasificación tentativa para el recuento microbiano del aire de diversas zonas de procesado, (CUADRO 5).

CUADRO 5 Clasificación para el recuento microbiano del aire de diversas áreas de procesado

Productos de la zona	Recuento total ufc/m ³		Mohos y levaduras ufc/m ³	
	Bueno	Malo	Bueno	Malo
Leche, queso Cottage	1,5x10 ²	1,5 x10 ³	5,0 x10 ¹	1,2 x10 ³
Quesos madurados	3,0 x10 ²	2,0 x10 ³	4,0 x10 ²	2,0 x10 ³

FUENTE: ROBINSON, (1987)

2.2.6 Manipuladores de alimentos. MORTIMORE y WALLACE, (1996), señalan que las fuentes de *Staphylococcus aureus* tienen un origen humano, por ejemplo a partir de la piel, nariz, garganta, cortes, y heridas. Por lo tanto, se transmite fácilmente a los alimentos mediante la manipulación y hábitos higiénicos deficientes. Para ello IDF/FIL (1990), indica que se deben usar desinfectantes y lavamanos a pedal a la entrada de cada área, para reducir el riesgo de contaminación. Por otro lado, HAYES (1993); IDF/FIL (1990); CODEX (1999), señalan que las personas con lesiones sépticas no deben manipular los alimentos, debido al alto porcentaje de portadores nasales humanos de *S. aureus*, por lo cual todos los operarios deben emplear guantes de un solo uso y mascarillas. Además, el movimiento del personal en las distintas áreas de la sala de proceso debe ser controlado IDF/FIL (1990).

2.2.7 Higiene en la superficie de los equipos. Una buena limpieza se obtiene cuando no quedan residuos orgánicos sobre la superficie de los equipos que faciliten la propagación de bacterias, es por ello, que con el uso de la higienización se reducen o destruyen el número de bacterias presentes en éstos (POBLETE, 1998).

Los sitios de multiplicación de bacterias en la plantas de productos lácteos, principalmente de especies *Bacillus*, se generan en la sección del pasteurizador, y tanques de almacenamiento de la leche previo a la coagulación y adición de los cultivos (HULL **et al.** 1992). BACHMANN y SPAHR (1995), indican que los microorganismos pueden multiplicarse en las instalaciones y llevar a una permanente contaminación. Por ejemplo LEHMANN **et al.** (1992), reportaron recuentos total de bacterias en leche cruda del orden de 2 a 6×10^6 ufc/ml en cinco silos, pero al pasteurizar la leche, el número de bacterias de la leche sobre la superficie de las placas del pasteurizador incrementó paulatinamente desde un recuento inicial de 7×10^3 a 2×10^4 ufc/ml, para las primeras 10 horas de operación del pasteurizador a 72°C . Posteriormente los recuentos aumentaron a mayor velocidad, llegando a 2×10^6 ufc/ml a las 16 horas de operación del equipo. Para solucionar esta problemática, los autores señalan que los recuentos de bacterias en leche cruda deben ser minimizados e implementar un procedimiento de lavado con agua al pasteurizador, aproximadamente cada 6 a 8 horas de uso de este equipo.

El control de la presencia de bacterias sobre los equipos lácteos, es importante para evaluar la eficiencia del proceso de limpieza y para asegurar las condiciones higiénicas de la planta. (ROBINSON, 1987). En el CUADRO 6 se presentan grados de limpieza, según el número de microorganismos sobre las superficies limpias de equipos lácteos.

CUADRO 6 Grados de limpieza, según presencia de microorganismos en la superficies limpias de equipos de procesos lácteos.

Grado	Bacterias /100 cm²	Bacterias /cm²
Bueno	< 10	< 0,1
Satisfactorio	10 – 50	0,1 – 0,5
No satisfactorio	> 50	> 0,5

FUENTE: ROBINSON, (1987)

El mismo autor también señala, que 10 bacterias viables por 100 cm^2 , o 10 bacterias por 100 ml de producto, son suficientes para que ocurra una reducción en la vida útil de los productos lácteos.

HARRIGAN y MC CANCE (1968), propusieron la clasificación presentada en el CUADRO 7, basada en el número de bacterias por cm^2 de superficie muestreadas por el método de la tórula, para definir el estado higiénico de superficies de equipos lácteos.

CUADRO 7 Clasificación del estado higiénico de superficies, muestreadas por el método de la tórula.

Bacterias mesófilas (ufc/cm²)	Clasificación
Menor a 5	Satisfactorio
Entre 5 y 25	Regular
Más de 25	Insatisfactorio

FUENTE: HARRIGAN Y MC CANCE (1968).

BASTIAN y SIVELA (2000), indica que la limpieza de los equipos y las buenas prácticas de higiene del personal en el lugar de trabajo es básico para la seguridad de los productos. Particularmente, todo producto que esté en contacto con superficies se le debe dar una especial atención a la eficiencia y a los procedimientos de limpieza y sanitización sobre estos.

Por otro lado, DODD (1987), menciona que los equipos de lechería y estanques de almacenamiento son frecuentemente la mayor fuente bacteriana en la leche. Sin embargo, cuando la limpieza y desinfección se ha efectuado correctamente, la leche contribuye con menos de $1,0 \times 10^3$ ufc/ml de bacterias totales. Esto refleja la importancia y cuidado que debe tenerse en el manejo, lavado e higienización de los equipos.

Cuando los utensilios de lechería y tarros de leche son mal lavados, la leche generalmente contiene más de $5,0 \times 10^5$ ufc/ml (Thomas y Thomas, citado por POBLETE, 1998). Además GEHRIGER (1980), señala que la cantidad de bacterias presentes en tarros lecheros aumenta considerablemente en el tiempo ocurrido entre la limpieza y uso de éstos.

2.2.8 Higiene en la planta lechera. Según IDF/FIL (1984), el principal objetivo de chequear la higiene de una planta, es para asegurar que las superficies no contaminen el

producto; sin embargo, si la contaminación ha tenido lugar, es posible determinar a través de muestreos en la línea, el lugar donde ha ocurrido la contaminación bacteriológica o química. En la FIGURA 1 se indican las posibles fuentes de contaminación post pasteurización, señaladas por IDF/FIL (1994).

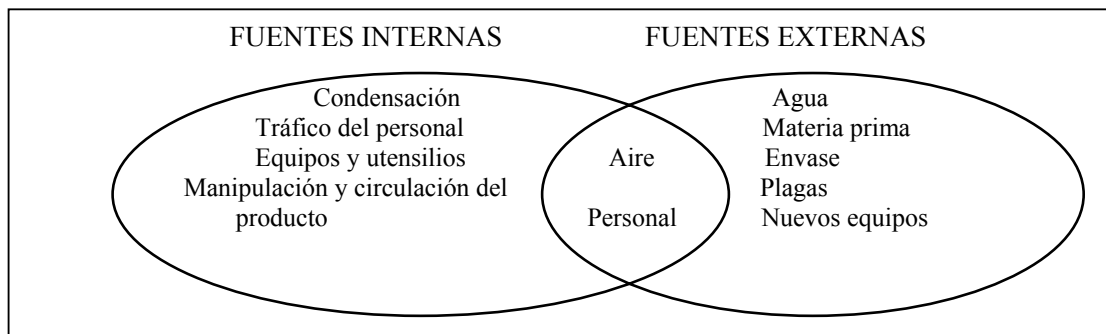


FIGURA 1: Fuentes de contaminación del producto proveniente desde el interior y del exterior de la planta procesadora de alimentos.

FUENTE : IDF/FIL (1994).

IDF/FIL (1994), indica que las fuentes de contaminación externas deben estar bajo control para asegurar la calidad del producto. Las fuentes internas inciden en la vida útil de éste, por lo tanto deben estar a sujetas a estrictos sistemas de control. El aire y el personal en cambio, están representadas al centro de la figura, debido a que son potenciales fuentes de contaminación.

La frecuencia de limpieza de la planta debe ser la necesaria, siendo como mínimo una limpieza diaria al terminar la jornada, para mantener el control microbiológico, asegurar la inocuidad del producto y cumplir con los requisitos de higiene (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF, 1988).

2.3 Sobrevivencia y crecimiento de los microorganismos en queso

La sobrevivencia y el crecimiento de los microorganismos en queso, depende entre otros parámetros, de la actividad de agua del mismo. Las bacterias crecen generalmente entre valores de a_w de 1,0 y 0,90. Debido a que el queso Gouda tiene un valor de a_w de 0,95,

éste se encuentra dentro del rango de posible crecimiento de bacterias (SPAHR y URL, 1994). EYLES (1992), indica que la sobrevivencia y crecimiento de algunos microorganismos depende además, de los compuestos inhibidores producidos por los cultivos lácticos, como son los ácidos producido por éstos, y la flora láctica que se desarrolla durante la maduración. Por ejemplo, en una investigación realizada por ERKMEN (1995), los recuentos de *S. aureus* disminuyeron en 3,7 log durante 75 días de maduración en queso Feta, fabricado con 2% de cultivos. Por lo tanto, varios factores pueden influenciar la presencia y sobrevivencia de patógenos en quesos, como por ejemplo, la capacidad de tolerar el calor, al ácido y la sal, además, dependerá de la cantidad de patógenos presentes en la leche y después de la pasteurización, de los cultivos lácticos y la adición de aditivos, entre otros (JOHNSON et al., 1990).

Los quesos madurados de pasta suave, presentan un riesgo relativamente alto para que se desarrollen los microorganismos patógenos (EYLES, 1992). BACHMANN y SPAHR, (1995), estudiaron que en los quesos de pasta semiduros, las bacterias patógenas, sobrevivieron más que en los quesos de pasta dura. Esto se puede deber a un incremento del número de patógenos en la cuajada. Sin embargo, después de 90 días cuando la maduración es completa en los quesos de pasta suave, todas las bacterias excepto *Listeria monocytogenes* disminuyó por debajo de los límites de detección.

La presencia de bacterias coliformes en los quesos, puede deberse a condiciones deficientes de manufactura, como por ejemplo, manipuladores con presencia de coliformes en las manos ó agua no clorada, entre otras. Las bacterias coliformes pueden estar solamente activas durante las etapas iniciales de fabricación (prensado y salado). Ello debido a la producción de ácido láctico durante el primer día dejando sin sustrato (lactosa) a los coliformes para formar gas a partir de ésta. Además, estas bacterias se inhiben por el descenso del pH en el rango 5,0 a 5,2 (ALAIS, 1985).

PASCUAL (1983), señala que una pasteurización deficiente acarrea riesgos de fermentaciones anormales, con hinchazones tempranas en el queso y sabor anormal, provocado por los coliformes. Estos no sobreviven a la pasteurización, por lo tanto son

indicadores de un inadecuado proceso o de una contaminación post pasteurización (IDF/FIL, 1994). Ello concuerda con lo estudiado por JOHNSON *et al.* (1990), quienes, no encontraron coliformes en muestras de cultivos, sales y en los equipos, sin embargo, si se encontraron estos microorganismos, en el tanque de coagulación, lo que indica que ocurrió una contaminación posterior a la pasteurización.

2.4 Problemas tecnológicos de origen microbiano más frecuentes en quesos

Según HAYES (1993), la alteración bacteriana de los quesos ocurre con mayor frecuencia durante su elaboración y maduración. Pudiendo originar alteraciones en el queso, ya sea, en su aspecto y propiedades organolépticas (GARCIA *et al.*, 1990).

Un problema que se presenta con relativa frecuencia, es la presencia de gas en el queso, comúnmente conocido como hinchazón y que se puede deber a la leche cruda contaminada por coliformes o por bacterias ácido butíricas, con consecuencia de fermentaciones indeseables. Algunos microorganismos producen H₂ y/o H₂S, dando origen a agujeros de gas y desagradables sabores (Kosikowski, citado por POLYCHRONIADOU, 2001). Estos defectos, sin embargo, son debido a una mala calidad higiénica de la leche o por indeseables condiciones de higiene durante el proceso y no tienen relación con la normal y deseable formación de ojos, de algunas variedades de quesos (POLYCHRONIADOU, 2001).

2.4.1 Hinchazón temprana. Los agentes causantes de esta alteración son microorganismos del género *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Aerobacter*, y levaduras, siendo los tres últimos géneros los más frecuentes (JIMENEZ, 1989). SORIA (1983), también coincide en que una de las principales bacterias responsables de la hinchazón temprana es *E. coli*, encontrándose ésta en el estiércol, en los utensilios mal lavados, en el suelo y en el tracto intestinal del hombre y de los animales. Además los coliformes son generalmente el principal problema, cuando los cultivos iniciadores fallan, debido a la infección con bacteriófagos o por la presencia de antibióticos en la leche (MULLAN, 2000).

La alteración temprana se traduce en la aparición de ojos de pequeño diámetro, de cavidad lisa y brillante, probablemente debido a que su formación tiene lugar cuando la actividad de agua es alta, pudiendo afectar a toda la masa y llegar a producir una hinchazón importante (SUAREZ y COLOMO, 1990). Este defecto es debido a la fermentación de la lactosa con formación de gas, una vez consumida la lactosa, situación que pasa a lo máximo en los primeros tres días. Además, estas fermentaciones pueden manifestarse en la tina donde el grano de cuajada se vuelve esponjoso con burbujas de gas flotando en la superficie del suero. También se puede verificar en la prensa donde las palancas de la prensa son levantadas y empujadas por el aumento de volumen del queso (FAO, 1983).

Cuando la hinchazón precoz está producida por levaduras que fermentan la lactosa se forma un olor a alcohol avinagrado, o a manzanas fermentadas. En cambio, si se originan por coliformes, se obtiene un queso con sabores picantes y amargos y se forman pequeñas aberturas de poco diámetro (JIMENEZ, 1989).

GALESLOOT y HASSING (1983), afirman que el nitrato y el nitrito formado no inhiben el crecimiento de las bacterias coliformes en queso, pero cambia el metabolismo de estas bacterias, produciendo una menor cantidad de gas a partir de la lactosa. Además, el nitrato previene la producción de hidrógeno y no la producción de dióxido de carbono.

2.4.2 Hinchazón tardía. Se caracteriza por un aumento de volumen más marcado que en la hinchazón por coliformes y con la formación de ojos muy numerosos que suelen agruparse en forma de racimos y frecuentemente de gran diámetro (FAO, 1983). Además, alrededor de los ojos aparece una tonalidad más clara que la del resto de la masa (SORDO, 1983). En algunos quesos se presentan verdaderas cavidades con 10 cm o más de diámetro, provocando algunas veces grietas en la superficie del queso. (FAO, 1983). Una evolución grave de este defecto lleva a zonas localizadas de putrefacción (ALAIS, 1985).

Las bacterias esporuladas anaerobias del género *Clostridium*, son las causantes de la hinchazón tardía del queso, en las salas de maduración. Esto resulta de la fermentación del lactato de calcio, lo cual da como resultado de la producción de ácido butírico y acético y gases como hidrógeno y anhídrido carbónico (POLYCHRONIADOU, 2001).

En la fermentación del ácido butírico, la glucosa es transformada a ácido acético, ácido butírico, alcohol de etílico, alcohol butil, acetona, CO₂ y H₂. La fermentación butírica produce grandes cantidades de gas y es considerado dañino para el cuerpo y sabor de estos quesos. La bacteria responsable es el clostridio, particularmente *C. tyrobutyricum*. (POLYCHRONIADOU, 2001), siendo el principal origen de éstos, los excrementos. La hinchazón tardía no se produce en los quesos de pasta blanda, sino en los de pasta dura y de corteza sólida. La presencia de la corteza hace posible la retención de gases que dan origen a un aumento en la presión interna. Por otra parte, las temperaturas elevadas que experimenta la cuajada de los quesos de pasta cocida tienen probablemente una influencia favorable a causa del descenso del potencial redox, de la formación de compuestos fácilmente asimilables por los clostridios (ALAIS, 1985).

C. tyrobutyricum es un bacilo Gram (+), anaerobio estricto, capaz de metabolizar el lactato como fuente de carbono. Sus condiciones óptimas de crecimiento son a una temperatura de 35°C, a un pH de 5,8 y con bajos niveles de sal en los quesos, es termorresistente y bajo condiciones desfavorables, son capaces de esporular (MARTLEY y CROW, 1996). El hábitat principal de estas bacterias es el suelo, a través del cual se puede contaminar el ensilaje utilizado como alimento para los animales, llegando posteriormente al tracto intestinal de ellos y finalmente a la leche utilizada para la elaboración de queso (DASGUPTA y HULL, 1989).

La hinchazón tardía depende del número inicial de esporas de *C. tyrobutyricum* presentes en la leche. El número de esporas de *C. tyrobutyricum* necesarias en leche para causar hinchazón tardía en queso Suizo y variedades de queso Gouda es de 1 a 5 esporas/ml (Teuber, Das Gupta y Hull, citados por HULL **et al.**, 1992). Además en una investigación realizada por SUAREZ y COLOMO (1990), se estableció que el número

crítico de esporas causantes de la fermentación butírica en los quesos Gouda de 12 kilos, proveniente de Holanda e Italia, va de 5 a 10 esporas por litro. En Holanda la contaminación en verano va de 200 a 1.000 esporas/l y en invierno de 2.000 a 20.000 esporas/l. También HERMAN, **et al.** (1995), señalan que el número límite de esporas que causan el defecto de hinchazón tardía, de acuerdo a los tipos de tratamientos aplicados varía desde 5 esporas/l (sin adición de nitrato o sin bactofugación) a 1×10^6 esporas/l (con adición de nitrato o con bactofugación) de leche utilizada en la elaboración del queso.

IDF/FIL (1987), señala que la hinchazón tardía aparece generalmente, diez días a dos meses después de su elaboración, lo que lo distingue del defecto producido por los coliformes, el que ocurre entre el primero y el segundo día de fabricación. La temperatura de conservación, humedad y el pH del queso influyen en la velocidad del desarrollo del defecto. GILLES y FRYER (1984), señalan que mantener un queso Gouda por un periodo de tiempo mínimo de 3 semanas a 7°C, coincide con el tiempo que se demoraría el proceso de difusión de la sal hasta alcanzar una concentración $\geq 3,5$ % de sal en el centro del queso. Ello indica que la baja temperatura, es una buena medida para evitar el defecto de la hinchazón tardía.

El desarrollo de las bacterias butíricas en el queso, es muy lento a causa del bajo pH y la presencia de sal. Es por ello, que el gas producido se dirige lentamente hacia los lugares donde ya se han desarrollado los ojos, aumentándose estos de tamaño. Los daños que sufre el queso se deben, por lo tanto, a la formación de ojos muy grandes y sabores indeseables (FAO, 1983).

3. MATERIAL Y METODO

3.1 Lugar del estudio

Los análisis microbiológicos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL) de la Universidad Austral de Chile, Valdivia. Para efecto del estudio, se analizaron muestras provenientes de una empresa proveniente de la décima Región.

3.2 Descripción de los puntos de muestreo en la línea de proceso de elaboración del queso tipo Gouda

Se realizaron un total de 5 muestreos, entre los meses de noviembre del 2001 y febrero del 2002, compuesto por 5 unidades provenientes de 5 diferentes tinas. Para los análisis se tomaron muestras en nueve puntos de la línea de proceso en cada fecha de elaboración, según se señala en el CUADRO 8, incluyendo el queso a la salida de prensa, queso con cero días de maduración es decir, después del aireado, (a 48 h de la salazón) y el mismo queso a los 28 días de maduración (producto terminado). En el ANEXO 1 se presenta la línea de flujo de elaboración del queso tipo Gouda de la empresa.

CUADRO 8 Puntos muestreados en la línea de proceso de queso tipo Gouda con su respectivo número de muestras.

Puntos muestreados	Nº de muestras/fecha	Total en 5 fechas de elaboración
Leche pasteurizada a tina llena	5 *	25
Manipuladores	2	10
Superficies de tina pre prensado	2	10
Queso salida prensado	5 *	25
Moldes	3	15
Ambiente	4	20
Agua	3	12
Queso día cero	5 *	25
Queso con 28 días de maduración	5 *	25

* Correspondiente a 5 tinas diferentes.

Con el objetivo de conocer la variación de la contaminación microbiana durante la elaboración del queso tipo Gouda producido en una empresa, se realizó un seguimiento en el proceso desde la leche pasteurizada a tina llena, al queso salida de prensa, al queso en el día cero, y con 28 días de maduración. Para realizar el seguimiento, se identificó con el número de tina y la fecha de elaboración correspondiente, a cada uno de los quesos del estudio.

3.3 Plan de toma de muestras

3.3.1 Leche pasteurizada. La toma de muestra de leche pasteurizada se realizó según lo descrito en el método FIL / IDF N°50C (1995), tomando un volumen inferior a 100 ml, en forma aséptica y con previa agitación de la leche en las tinas. La muestra se colocó en frascos estériles de 250 ml.

3.3.2 Manos de manipuladores. Para muestrear las manos de los manipuladores se utilizó la técnica de lavado con tórula según lo descrito en AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA, 1992). Esta técnica consistió en humedecer una tórula en 5 ml de diluyente buffer fosfato y lavar la superficie de las palmas de las manos, haciendo rotar la tórula, para luego lavarla en el diluyente y drenar el exceso de éste en la pared del tubo. Luego se lavó la zona entre los dedos y se repitió la limpieza de la tórula para pasarla bajo las uñas. Finalmente, se quebró el extremo de la tórula en el lugar manipulado, dejando caer la porción con algodón dentro del tubo con diluyente. El muestreo se le realizó a dos manipuladores por fecha de muestreo, sin repetir ninguno de ellos durante el transcurso del estudio.

3.3.3 Superficie de moldes. La toma de muestras de las superficies de los moldes, fue realizada en forma aleatoria, controlando 3 moldes por fecha. El muestreo se realizó empleando la técnica del lavado con tórula según lo descrito por APHA, (1992). En ésta técnica se utilizó 5 ml de diluyente buffer fosfato para humedecer la tórula y lavar la superficie a muestrear, delimitándola con plantillas de 5 cm. Se tomaron 5 superficies muestreando un total de 25 cm². Entre cada superficie se lavó la tórula en el diluyente y se drenó el exceso de éste en la pared del tubo. Finalmente, se quebró el extremo de la

tórula en el lugar manipulado y se dejó caer la porción con algodón dentro del tubo con diluyente.

3.3.4 Superficies de tina de pre prensado. En el muestreo de superficies de la tina de pre prensado, se diferenciaron dos tipos de superficies, el fondo de la tina, considerada como superficie rugosa, para ello se empleó la técnica de lavado con tórula, según está descrito en 3.3.3. Para las caras laterales de la tina, correspondientes a superficies lisas, se utilizó el método de impresión sobre el agar, con la placa “ RODAC ” (replicate organism direct agar contact), según APHA, (1992).

3.3.5 Ambiente. El muestreo de ambiente consistió en dejar expuesta al aire una placa de petri con agar papa dextrosa y una con agar plate count por 15 minutos (APHA, 1992). Se muestreó los siguientes puntos dentro de la sala de proceso: área de tina de coagulación, área tina pre prensado, sector de almacenamiento de moldes y sector de prensa.

3.3.6 Muestra de agua. La toma de la muestra, se realizó en distintos puntos: lavamanos de la sala de proceso, agua para lavado de equipos de la sala de procesos y en el laboratorio de la planta. La muestra se tomó en botellas de vidrio estériles de 250 ml, que contenían tiosulfito de sodio (0.01g/ml) para neutralizar el cloro, según se encuentra descrito en la Norma Chilena de Agua. NCh N° 409/2 (CHILE, INN, 1984).

3.3.7 Muestra de queso. La toma de muestras de queso al día cero (después del aireado), y con 28 días de maduración, se realizó de acuerdo a la norma FIL / IDF 50C (1995), con modificación. Se extrajo una muestra de aproximadamente 400 g, desde el centro del queso, mediante un corte rectangular, en lugar de extraer la muestra mediante dos cortes cuadrados y en forma diagonal, como lo indica la norma. Posteriormente las muestras fueron envasadas al vacío en film Cryo – Vac[®] y colocadas en una caja térmica a 5°C para su conservación y posterior transporte al laboratorio del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL), de la Universidad Austral de Chile, donde se realizaron los análisis microbiológicos.

Para el caso de las muestras de queso a la salida de prensa, se tomaron asépticamente rebanadas del bloque de la superficie de éste, con un tamaño aproximado de 300 g. En este caso, se tomó menos muestra para no romper demasiado el bloque de queso. Posteriormente las rebanadas fueron colocadas en bolsas asépticas.

Todas las muestras de superficies de moldes y tina, agua, manos de manipuladores, ambiente, leche y quesos, fueron almacenadas en una caja térmica a 5°C para su conservación y transporte al Laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL). Desde la toma de las muestras hasta su análisis transcurrieron aproximadamente 20 horas.

3.4 Metodología de análisis

3.4.1 Preparación de las muestras para su análisis. De la muestra de leche pasteurizada se tomaron 11 ml y se diluyeron en 99 ml de buffer fosfato, realizando así la dilución 10^{-1} (APHA, 1992). Del queso, se extrajeron asépticamente 11 g, obtenidos de distintos puntos de la muestra inicial (400 g), y se pesaron en una bolsa de “Stomacher“. Se agregaron 99 ml de buffer citrato al 2 % estéril, calentado a 45°C, lo que constituyó la dilución 10^{-1} , (APHA, 1992). Posteriormente la muestra se homogeneizó por 2 minutos a velocidad alta.

3.4.2 Análisis de leche pasteurizada a tina llena. Para controlar su calidad microbiológica, se realizaron los siguientes análisis:

3.4.2.1 Recuento de enterobacterias. Para la cuantificación de estos microorganismos, se realizó una dilución adicional de la leche (10^{-2}). Se sembró 1 ml de la dilución 10^{-1} y 0,1 ml (dilución 10^{-2}) en placas con agar bilis rojo neutro cristal, con 1 % de glucosa (BRNCVG). Las placas se incubaron a $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h (APHA, 1992). El recuento de enterobacterias se realizó en aquellas placas que contenían entre 20 a 200 colonias, de color rojo y de diámetro superior a 1 ó 2 mm, rodeadas por un precipitado rojo.

3.4.2.2 Presencia de *Escherichia coli*. A partir de las placas de agar BRNCVCG se tomaron tres colonias típicas y se sembraron separadamente sobre agar nutritivo inclinado, los tubos se incubaron a 35°C por 24 h. Posteriormente, se repicaron estos cultivos a tubos con caldo peptonado y caldo bilis verde brillante al 2% respectivamente, los cuales se incubaron en baño maría a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ por 24 h. Para la lectura, se consideró positiva la prueba al existir producción de gas en los tubos con caldo bilis verde brillante al 2% y la prueba de indol positiva en el tubo con caldo peptonado (presencia de un anillo rojo al agregar el reactivo de Kovacs). El resultado se informó como presencia o ausencia de *E. coli* (RIVERA, 2001).

3.4.2.3 Presencia de *Staphylococcus aureus*. Se determinó por el método directo de siembra, inoculando en total 1 ml de la leche distribuída en 3 placas (0,3 , 0,3 y 0,4 ml) de agar Baird Parker. Las placas se incubaron a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 h y se confirmaron tres colonias sospechosas mediante la prueba de la coagulasa. Para esta prueba se repicaron 3 colonias sospechosas de color negro brillante con halo, a tubos con caldo cerebro corazón, los cuales fueron incubados a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h. Se tomó 0,1 ml de este cultivo y se inoculó a 0,3 ml de plasma de conejo con EDTA. Los tubos se incubaron a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 6 a 24 h, observándose durante este tiempo la coagulación del plasma (I.C.M.S.F., 1988).

3.4.2.4 Recuento total de bacterias mesófilas. Se realizaron diluciones de 10^{-2} y 10^{-3} de la leche, sembrando 1 ml (dilución 10^{-1}), 0,1 ml (dilución 10^{-2}) y 1 ml de la dilución 10^{-3} (9 ml buffer fosfato + 1 ml de la dilución 10^{-1}), para ser sembradas en placas utilizando el método estándar o en profundidad, con agar Plate Count. La incubación se hizo a $32^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 h (APHA, 1992).

3.4.2.5 Número más probable (N.M.P) de bacterias anaerobias esporuladas. Se realizó de acuerdo al método para enumeración de esporas de *C. tyrobutyricum*, mediante la técnica del número más probable (NMP), descrita por FRYER y HALLIGAN (1976). Para el análisis, a una muestra de 50 ml de leche, se le aplicó primero un tratamiento térmico en un baño de agua a $80^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 minutos,

controlando la temperatura en un frasco control con igual volumen de agua destilada, bajo las mismas condiciones que las muestras. Alcanzada la temperatura de $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, se controló el tiempo de 10 minutos. Posteriormente las muestras fueron enfriadas para ser sembrada en series de tres tubos que contenían medio RCM – Lactato (Reinforced Clostridial Medium – Lactato). Los tubos con el caldo de cultivo fueron calentados a ebullición previo a su inoculación, para extraer el aire. Los tubos se inocularon con 1ml, 0,1ml y 0,01ml de leche, respectivamente y se sellaron con 2 ml de agar - agar al 2%. La incubación se realizó a 37°C por 7 días. Para la lectura se consideró la producción de gas en los tubos, visualizado por el levantamiento del tapón de agar, indicando el desarrollo de bacterias anaerobias esporuladas. A partir de los tubos positivos de cada serie de diluciones se formó una clave y se aplicó la tabla del Número más Probable (N.M.P), (APHA, 1992). Como se realizó siembra directa, para el valor del N.M.P de la tabla, se consideró la dilución 10^{-1} como central.

3.4.3 Control microbiológico de manipuladores. Se controló la presencia o ausencia de los siguientes microorganismos en las manos de los manipuladores:

3.4.3.1 Presencia de *S. aureus*. A partir de los tubos con buffer fosfato (técnica de la tórmula 3.3.2), se sembró sobre agar Baird Parker según lo especificado en 3.4.2.3 (APHA, 1992).

3.4.3.2 Presencia de enterobacterias. A partir de los tubos con buffer fosfato (técnica de la tórmula 3.3.2), se sembró 1 y 0,1 ml en agar BRNCVG, para luego confirmar la presencia de *E. coli*, según lo descrito en 3.4.2.2.

3.4.4 Control microbiológico de superficie de tina de pre prensado

3.4.4.1 Recuento total de bacterias mesófilas. Para analizar los costados de la tina se utilizó el método de placas RODAC (replicate organism direct agar contact), con agar Plate Count como medio de cultivo, luego se incubó a $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 h (APHA, 1992). Los resultados se informaron como ufc/28 cm². Para el fondo de la tina, se sembró 1 y 0,1 ml en agar Plate Count, a partir de los tubos con buffer fosfato

(técnica de la tórmula 3.3.3), posteriormente se incubó bajo las condiciones señaladas anteriormente. Los resultados se informaron como ufc/25 cm².

3.4.4.2 Recuento de enterobacterias. A partir de los tubos con buffer fosfato (técnica de la tórmula 3.3.3), se realizó la siembra de 1 y 0,1 ml en agar B.R.C.V.G incubando las placas a $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h, para luego confirmar la presencia de *E. coli*, según lo descrito en 3.4.2.2.

3.4.5 Control microbiológico de moldes.

3.4.5.1 Recuento total de bacterias mesófilas. A partir de los tubos con buffer fosfato (técnica de la tórmula 3.3.3), se inoculó 1 y 0,1 ml de las muestras en agar Plate Count, incubando a 32°C por 48 h.

3.4.5.2 Recuento de enterobacterias. Se realizó la siembra según lo especificado en 3.4.2.1, confirmando la presencia o ausencia de *E.coli* (3.4.2.2).

3.4.6 Control de ambiente. Se dejó abierta una placa de petri durante 15 minutos con el medio seleccionado para el microorganismo a contabilizar:

- **recuento total de bacterias mesófilas**, placas con agar Plate Count incubadas a $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 h.
- **recuento de mohos y levaduras**, placas con agar papa dextrosa, incubadas durante 5 días a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.4.7 Análisis de agua. Se realizó mediante la técnica del número más probable para coliformes totales y fecales (NMP), según la Norma Chilena de agua, NCh 409/1 (CHILE, INN, 1984).

3.4.8 Análisis microbiológico de queso a la salida de prensa. Para estas muestras se utilizó la metodología de análisis según se describe en (3.4.2), realizando los siguientes análisis:

- **recuento de enterobacterias**

- **presencia de *E. coli***

3.4.9 Análisis de muestras de queso al día cero y a los 28 días de maduración.

Para estas muestras se utilizó la misma metodología de la leche pasteurizada, descrita en (3.4.2), realizando los siguientes análisis:

- **recuento de enterobacterias**
- **presencia de *S. aureus***
- **N.M.P. de bacterias esporuladas anaerobias.** Se realizó de acuerdo al método para enumeración de esporas de *C. tyrobutyricum*, mediante la técnica del número más probable (NMP), descrita por FRYER y HALLIGAN (1976). Para obtener la muestra, se extrajeron asépticamente 11 g del queso, obtenidos de distintos puntos de la muestra inicial (400 g), y se pesaron en un frasco Schott y se adicionaron 99 ml de buffer citrato al 2 % estéril, calentado a 45°C, lo que constituyó la dilución 10^{-1} , (APHA, 1992). Luego se le aplicó un tratamiento térmico en un baño de agua a 80°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 10 minutos, controlando la temperatura en un frasco control con agua destilada a las mismas condiciones que las muestras. Alcanzada la temperatura de 80°C $\pm 1^\circ\text{C}$ en el control, se tomó el tiempo de 10 minutos. Posteriormente las muestras fueron enfriadas para ser sembrada en series de tres tubos que contenían medio RCM – Lactato (Reinforced Clostridial Medium – Lactato). Los tubos con el caldo de cultivo fueron calentados a ebullición previa a su inoculación, para extraer el aire. Los tubos se inocularon con 1 ml (dilución 10^{-1}), 0,1 ml (dilución 10^{-2}) y 1 ml de la dilución 10^{-3} (9 ml buffer citrato al 2% + 1 ml de la dilución 10^{-3}) y se sellaron con 2 ml de agar – agar al 2%. La incubación se realizó a 37°C por 7 días. Para la lectura se consideró la producción de gas en los tubos, visualizado por el levantamiento del tapón de agar, indicando el desarrollo de bacterias anaerobias esporuladas. A partir de los tubos positivos de cada serie de diluciones se formó una clave y se aplicó la tabla del Número más Probable (N.M.P), (APHA, 1992).

3.4.10 Determinación de pH. Se midió directamente el pH a las muestras de leche pasteurizada con un potenciómetro, tomando un volumen no inferior a 100 ml, Para el caso de las muestras de queso a la salida de prensa y el queso con 0 y 28 días de

maduración, se realizó una dilución con agua destilada de 1:1 y se homogeneizó, para la determinación de pH, según la Norma Chilena 1671 (CHILE, INN, 1979).

3.4.11 Determinación de cloro residual. Se determinó el cloro libre residual (ppm), mediante el método colorimétrico del DPD, recomendado por la Norma Chilena de Agua, NCh 409/1 (CHILE, INN, 1984). Para ello se llenaron dos tubos con la muestra de agua y a uno se le adicionó el reactivo N,N – dietil – p- fenilendiamina. Posteriormente se comparó el color del tubo con el color del reactivo, con la escala de colores del equipo “HACH” y se hizo la lectura en ppm de cloro libre residual. Se tomaron muestras de agua al lavamanos de la sala de procesos, al agua para el lavado de equipos y laboratorio de la planta.

En el CUADRO 9 se presenta un resumen de los análisis realizados.

CUADRO 9 Análisis realizados en los distintos puntos de la línea de elaboración de queso tipo Gouda.

Muestras	Análisis							
	Rcto de Enterobacterias	Presencia de <i>E.coli</i>	N.M.P de Coliformes totales y fecales	Presencia de <i>S. aureus</i>	Rcto. total bacterias mesófilas	N.M.P de bacterias anaerobicas esporuladas	Rcto. de mohos y levadura	pH
Leche pasteurizada a tina llena	✓	✓		✓	✓	✓		✓
Queso salida prensa	✓	✓						✓
Queso día cero	✓	✓		✓		✓		✓
Queso con 28 días de maduración	✓	✓		✓		✓		✓
Manipuladores	✓			✓				
Superficie de tina pre prensado	✓	✓			✓			
Moldes	✓	✓			✓			
Ambiente					✓		✓	
Agua			✓					

3.5 Análisis de resultados

Los resultados obtenidos de los recuentos microbianos en leche y queso, fueron transformados a Log_{10} para el análisis estadístico.

Los recuentos en placa negativos ($< 1,0$ ufc/ml de leche pasteurizada a tina llena), se le asignó el valor de 1,0 para su transformación a Log. Para los recuentos negativos de muestras de queso (< 10 ufc/g), se le asignó el valor de 9,0 y para recuentos negativos de la siembra en superficie con valores (< 100 ufc/g), se le asignó el valor de 99, para facilitar los análisis estadísticos. Cada uno de los valores mencionados corresponde a los límites de detección de las diferentes técnicas utilizadas. Para los resultados del NMP, a los valores $< 3,0/$ g ó ml, se les asignó el valor numérico de 2,0 para poder incluirlos en el análisis de datos.

Los valores de los resultados de las superficies expresadas en ufc/25 cm^2 y ufc/28 cm^2 fueron transformados a ufc/ cm^2 , para poder realizar una comparación de éstos.

Los resultados fueron evaluados mediante un análisis de varianza de una vía, utilizando el software estadístico Statistical Graphics Plus 2.0 para Windows. Esta prueba se utilizó en los resultados de queso a la salida de prensa y queso con 0 y 28 días de maduración, para conocer si existían diferencias estadísticamente significativa entre las fechas de elaboración y entre los quesos, provenientes de una misma fecha. Posteriormente se aplicó el test de rango múltiple (Test de Tukey), para definir donde existían las diferencias.

Los resultados de análisis microbiológicos en leche y queso con 28 días de maduración fueron comparados con las especificaciones del Reglamento Sanitario de los Alimentos (CHILE, 2000) y CASADO y GARCIA (1985). Los resultados de las superficies de moldes y tina de pre prensado fueron comparados con antecedentes obtenidos en la literatura (HARRIGAN y MC CANCE, 1968; ROBINSON, 1987).

4. RESULTADOS

4.1 Recuentos de bacterias mesófilas y enterobacterias en leche pasteurizada a tina llena

En la FIGURA 2 se presentan los recuentos entre fechas de elaboración de bacterias mesófilas y enterobacterias en leche pasteurizada, a tina llena. Se puede apreciar, que los recuentos de bacterias mesófilas estuvieron cercanos a log 5,0 ufc/ml, obteniéndose en la tercera fecha de elaboración (21/01/02) el promedio más bajo, de $\log 4,6 \pm 0,37$ ufc/ml. El recuento más alto se observó en la segunda fecha de muestreo (10/01/02) con un valor de $\log 5,2 \pm 0,13$ ufc/ml.

Los recuentos de enterobacterias presentaron tendencia a aumentar durante el estudio, ya que hubo un aumento de los recuentos entre la segunda fecha y posteriores fechas de elaboración, con un máximo de $\log 1,9 \pm 2,06$ ufc/ml en la cuarta fecha (05/02/02). En la primera fecha de elaboración en cambio, no se obtuvieron recuentos de enterobacterias. Los valores de la FIGURA 2, corresponden al promedio de 5 repeticiones por fecha de elaboración. El test de Barlett arrojó un valor P menor a 0,05 por lo cual no se aplicó el ANDEVA (ANEXO 2.2, 2.3).

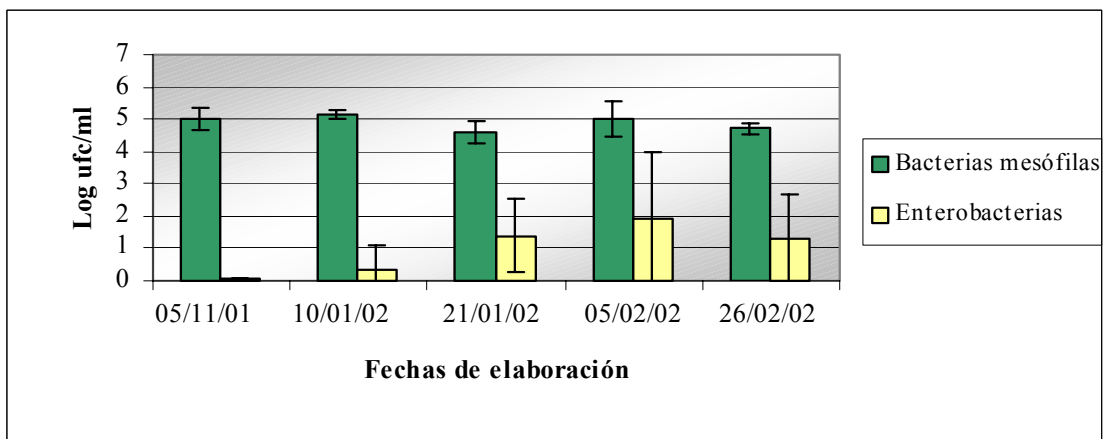
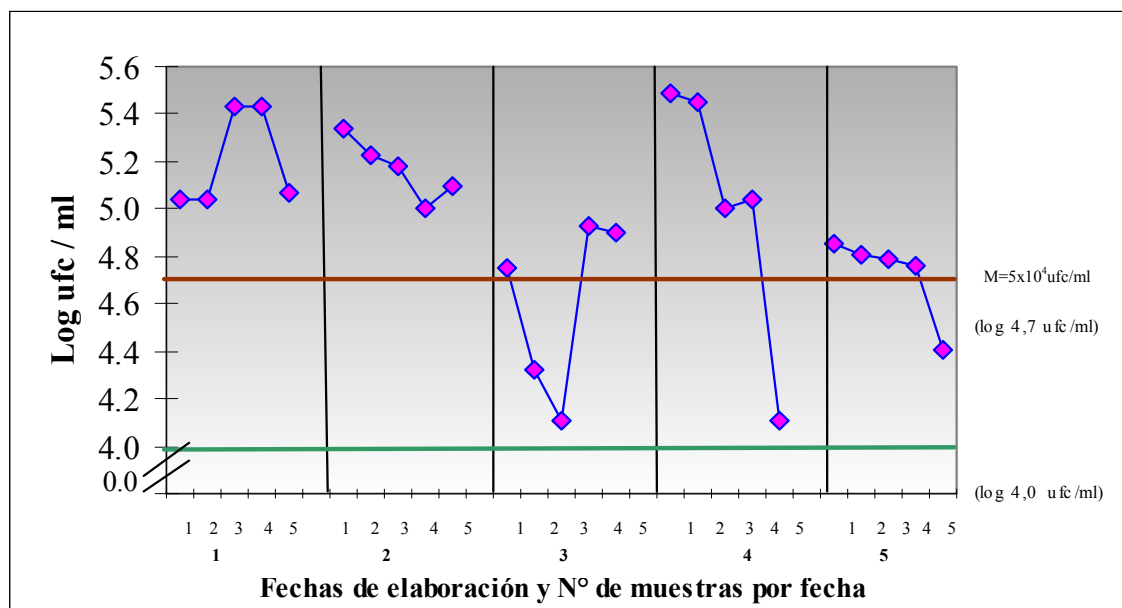


FIGURA 2 Recuentos de bacterias mesófilas y enterobacterias en leche pasteurizada a tina llena.

La FIGURA 3 muestra los recuentos de bacterias mesófilas en leche pasteurizada por fechas de elaboración y su relación con los valores de referencia del Reglamento Sanitario de los Alimentos (R.S.A), (CHILE, MINISTERIO DE SALUD, 2000). De acuerdo con los programas de muestreo del R.S.A, “m” es el parámetro microbiológico para el cual o por debajo del cual, el alimento no representa un riesgo para la salud. El parámetro microbiológico “M” indica que sobre este valor el alimento representa un riesgo para la salud. El valor $c = 2$, indica el número de muestras marginalmente



aceptables, con valores entre “m” y “M”.

FIGURA 3 Recuentos de bacterias mesófilas en leche pasteurizada y su relación con valores de referencia (M y m) del R.S.A (CHILE, 2000).

En esta figura se aprecia que, de un total de 25 muestras, el 84 % (21 muestras) no cumplió con lo especificado por el R.S.A (CHILE, 2000), que establece un valor máximo (M) de 5×10^4 ufc/ml (log 4,7) para bacterias mesófilas. Se observa que en las dos primeras fechas de elaboración, todas las muestras superaron el valor máximo permitido. En la tercera fecha sólo 2 muestras se encuentran entre los valores de referencia, en cambio en las últimas dos fechas, sólo una muestra se encuentra entre los parámetros microbiológicos “m” y “M”. Además, se puede apreciar que ningún recuento

se encuentra bajo “m” y que en todas las fechas de elaboración se sobrepasó la cantidad máxima de unidades defectuosas aceptables para cumplir con los requisitos establecidos en el R.S.A. En el ANEXO 2.1 se presentan los resultados del recuento de bacterias mesófilas y enterobacterias.

4.2 Análisis microbiológicos de los quesos a la salida de prensa, al día cero y con 28 días de maduración

En la FIGURA 4 se presentan las variaciones en los recuentos de enterobacterias entre fechas de elaboración en los quesos. Para el queso a la salida de prensa, el análisis de varianza arrojó diferencias estadísticamente significativas entre fechas de elaboración ($p < 0,05$). El Test de Tukey arrojó que existían diferencias entre la segunda, tercera fecha y quinta fecha de elaboración (26/02/02) (ANEXO 3. 2), con valores promedios de $\log 2,66 \pm 1,25$, $\log 2,94 \pm 0,62$, y $\log 5,00 \pm 0,71$ ufc/g respectivamente. A partir de la segunda fecha de elaboración, los promedios de los recuentos de enterobacterias en todas las muestras comenzaron a aumentar paulatinamente en el tiempo.

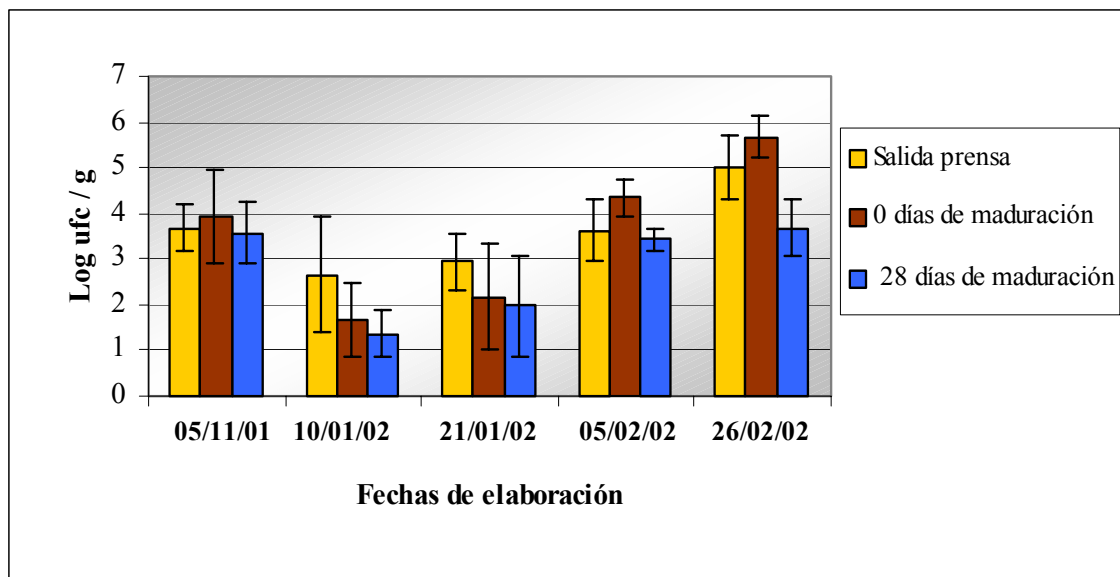


FIGURA 4 Recuentos de enterobacterias en queso tipo Gouda entre fechas de elaboración

Los quesos en el día cero y a los 28 días de maduración, presentaron gran variabilidad en los recuentos de enterobacterias entre las fechas de elaboración como se aprecia en la FIGURA 4. En el queso al día cero, el análisis de varianza indicó que existió diferencias significativas ($p < 0,05$) entre fechas de elaboración (ANEXO 4.2). El Test de Tukey mostró que estas diferencias significativas ($p < 0,05$) existieron entre la segunda y tercera fecha, con respecto a las demás fechas de elaboración, observándose un aumento en los recuentos en la cuarta y quinta fecha. A los 28 días de maduración no se encontró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la primera, cuarta y quinta fecha de elaboración. Sin embargo, se mantuvieron bajos los recuentos para la segunda y tercera fecha (ANEXO 5.2).

Para los quesos provenientes de una misma fecha de elaboración, no existió diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), en los recuentos de enterobacterias entre los quesos a la salida de prensa, el queso con 0 y 28 días de maduración elaborados en la primera, segunda y tercera fecha de elaboración. En cambio, en la cuarta y quinta fecha si existieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el queso en el día cero y con 28 días de maduración. (ANEXO 6.4, 6.5).

En la FIGURA 5, se presentan los recuentos de enterobacterias en el queso a los 28 días de maduración y su relación con los valores de referencia del R.S.A. (CHILE, MINISTERIO DE SALUD, 2000). Se puede apreciar que en la primera fecha dos muestras se encuentran dentro del rango de muestras provisoriamente aceptables y las restantes muestras superan el valor de (M). Sin embargo, en la cuarta y quinta fecha de elaboración, los recuentos de las cinco muestras de queso estuvieron todas por sobre del límite máximo permitido de 10^3 ufc/g (M), no ocurriendo lo mismo para la segunda y tercera fechas de elaboración, donde 10 muestras (40%) cumplieron con lo especificado por el R.S.A., encontrándose bajo del valor del parámetro microbiológico (m). Por otro lado, estas fechas cumplieron con los requisitos establecidos por el R.S.A., ya que no sobrepasaron el máximo de unidades defectuosas permitidas $c = 1$.

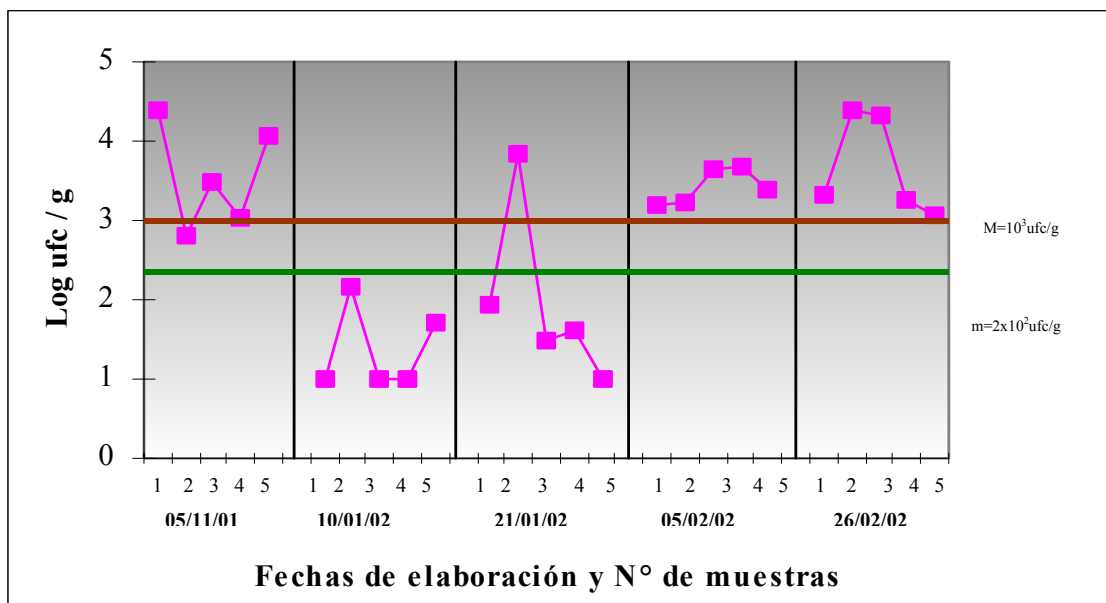


FIGURA 5 Recuentos de enterobacterias en el queso con 28 días de maduración y su relación con valores de referencia (M y m) según el R.S.A (CHILE, 2000).

Se detectó la presencia de *E. coli* en el queso a la salida de prensa, en un 64% de las muestras (16 muestras). En cambio, en el queso con cero días de maduración la bacteria se presentó en un 60% de las muestras (15) y en el queso con 28 días de maduración un 44% de las muestras (11 muestras) se encontró esta bacteria. En el ANEXO 3.1, 4.1 y 5.1 se presentan los recuentos de enterobacterias y presencia de *E. coli* en estos quesos.

4.3 Control microbiológico de manipuladores

En la FIGURA 6 se presentan los resultados del control microbiológico realizado a las manos de 10 manipuladores, lo cual arrojó un 90% de presencia de *S. aureus* (coagulasa positiva), un 70% de presencia de enterobacterias y un 20% de presencia de *E. coli*. Los resultados de los análisis microbiológicos obtenidos en forma individual para las manos de los manipuladores se presentan en el ANEXO 7.

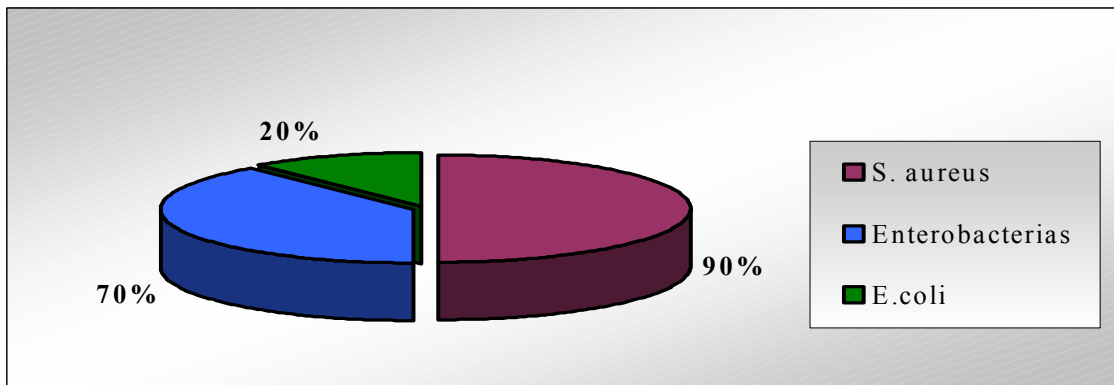


FIGURA 6 Presencia de *S. aureus*, enterobacterias y *E. coli* en manos de manipuladores

4.4 Control microbiológico de moldes

Los recuentos de enterobacterias en la superficie de los moldes de queso fueron bajos. (FIGURA 7), con excepción de la cuarta fecha, que presentó un promedio de 1,9 ufc/cm². Para las bacterias mesófilas el mayor recuento, se obtuvo en la tercera fecha de elaboración, con un promedio de 3,01 ufc/cm². Esta fecha presentó una gran variabilidad entre los recuentos, que fluctuaron entre 0,6 y 7,8 ufc/cm². Los valores de recuentos representan el promedio de tres moldes muestreados, por fecha de elaboración. Los resultados de los recuentos microbiológicos, se presentan en el ANEXO 8.

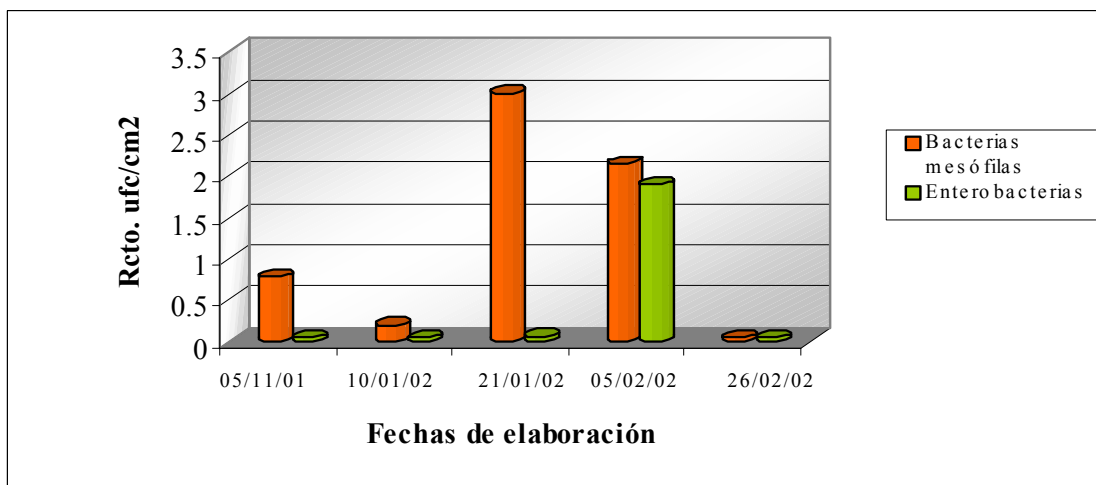


FIGURA 7 Recuentos de enterobacterias y bacterias mesófilas en superficies de moldes de queso

4.5 Control microbiológico en diferentes superficies de la tina de pre prensado

Los resultados de los análisis microbiológicos de recuento de bacterias mesófilas y enterobacterias, tomados desde el fondo de la tina de pre prensado, mediante la técnica de lavado con tórula, se presentan en la FIGURA 8. Se observa que la cuarta fecha tuvo el promedio de recuentos más altos para bacterias mesófilas con 2,05 ufc/cm² y para enterobacterias con 1,52 ufc/cm². La quinta fecha presentó el promedio de los recuentos más bajos, con 0,18 ufc/cm² para bacterias mesófilas.

El chequeo de la varianza arrojó, que no se podía aplicar un análisis de varianza, ANDEVA, a los resultados de los recuentos de bacterias mesófilas, ya que el valor P del test de Barlett fue menor a 0,05. En cambio, para los recuentos de enterobacterias el análisis de varianza señaló que no habían diferencias estadísticamente significativas entre las fechas de elaboración ($p > 0,05$). Sin embargo, en la FIGURA 8 se observan variaciones importantes de los recuentos de enterobacterias entre la segunda y tercera fecha, lo que se debió a la gran variación en los recuentos de las superficies de la tina de pre prensado analizadas (ANEXOS 9.2 y 9.3).

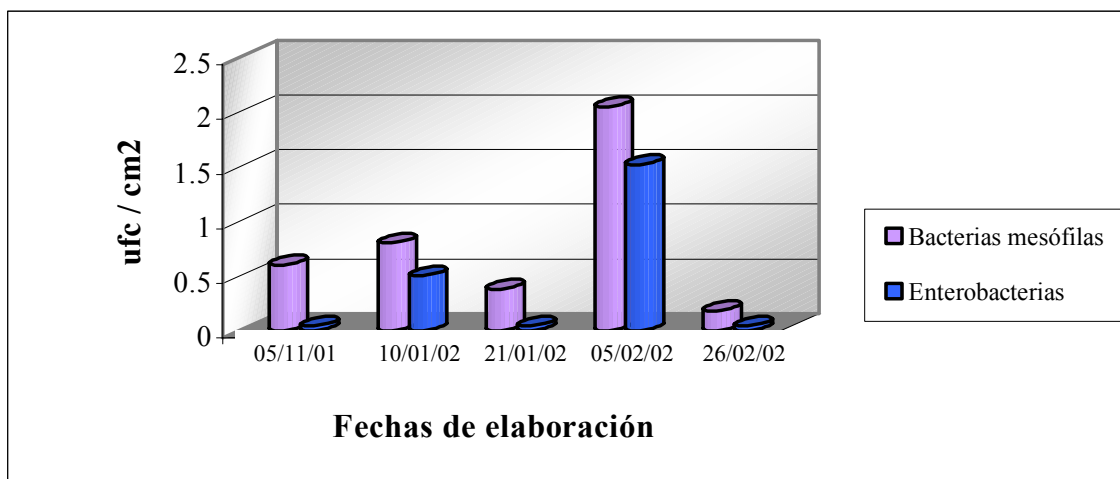


FIGURA 8 Recuentos de bacterias mesófilas y enterobacterias en superficies del fondo de la tina de pre prensado (técnica con tórula)

Los recuentos de bacterias mesófilas muestreados con placa RODAC en los costados de la tina de pre prensado, arrojaron valores que fluctuaron entre 2,04 ufc/cm² en la tercera fecha de elaboración y 0,18 ufc/cm² en la segunda fecha (FIGURA 9). El análisis de varianza indicó que existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre fechas de elaboración. El test de Tukey mostró que habían diferencias significativas ($p < 0,05$) en los recuentos entre la segunda y la tercera fecha de elaboración (ANEXO 9.4).

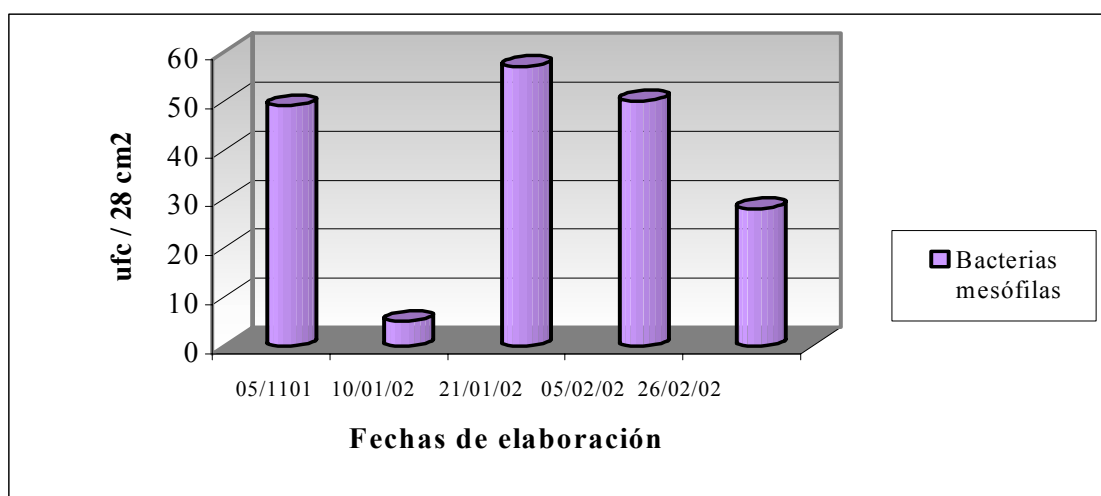


FIGURA 9 Recuento de bacterias mesófilas en superficies de los costados de la tina de pre prensado (placa RODAC)

En el ANEXO 9 se presenta los resultados de los análisis microbiológicos realizados en la superficie de la tina de pre prensado.

4.6 Control de ambiente

La FIGURA 10 presenta la variación entre muestreos en los recuentos de bacterias mesófilas, mohos y levaduras en distintas áreas de la sala de proceso. Se observa que en la primera fecha de muestreo predominaron en todos los sectores de la sala, las bacterias mesófilas, seguida de mohos y por último las levaduras. Además, en el sector de tina de coagulación y área de tina de pre prensado se vió una disminución en los recuentos de levaduras a partir de la tercera fecha de elaboración.

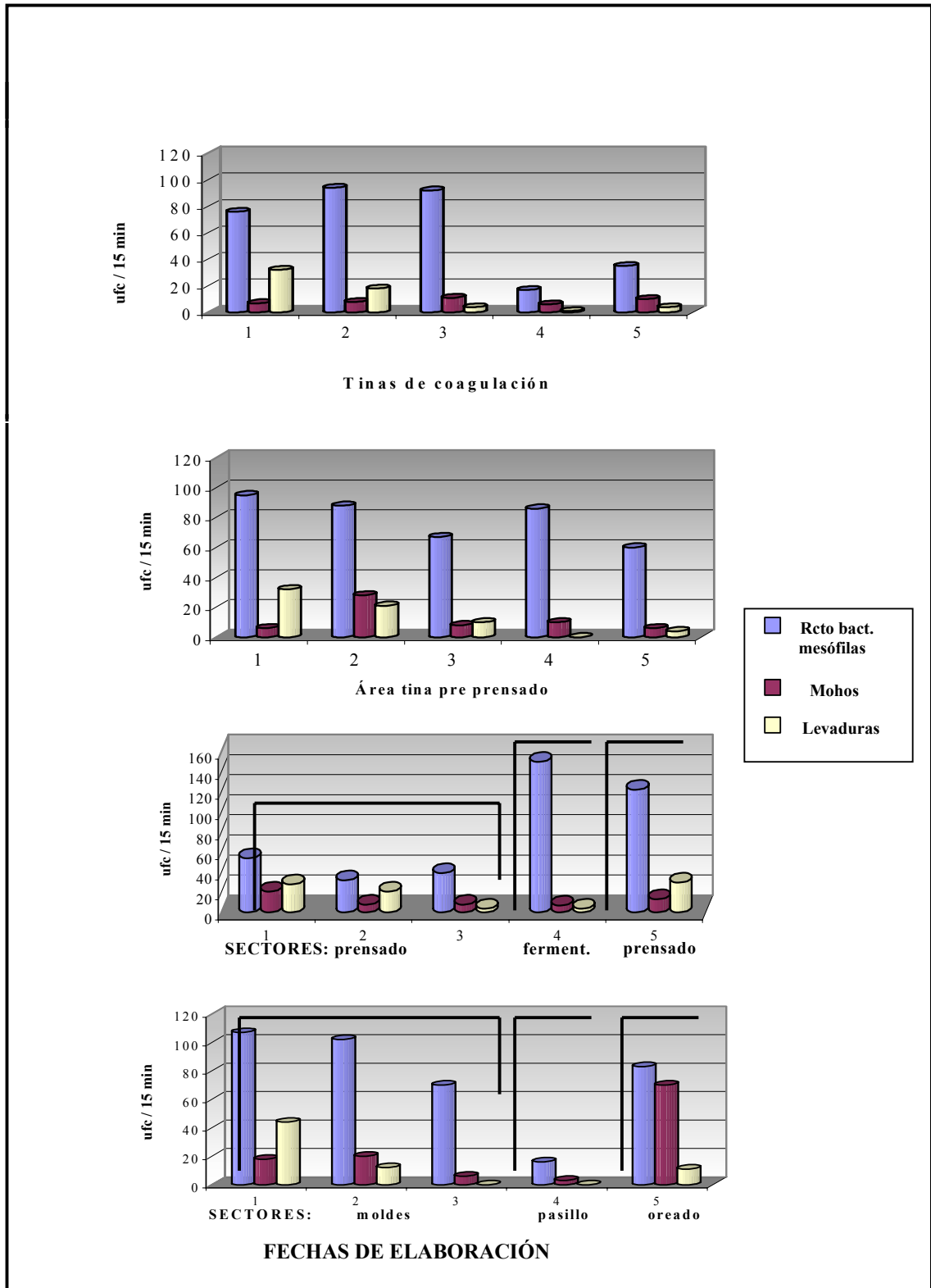


FIGURA 10 Recuentos de bacterias mesófilas, mohos y levaduras (ufc/15 minutos) en el ambiente de distintos sectores de la sala de proceso

En la cuarta fecha de elaboración se realizó el control de ambiente en el sector del pasillo de quesería y sector de oreo. En la quinta fecha éste se realizó en la sala de preparación de cultivo, en ambas fechas predominó las bacterias mesófilas (FIGURA 10). Cabe destacar que se tomaron cinco muestras por sector. En el ANEXO 10 se presentan los recuentos obtenidos del control de ambiente.

4.7 Número Más Probable (N.M.P) de bacterias anaerobias esporuladas presentes en la línea de producción de queso tipo Gouda

Sólo en la primera fecha de elaboración se detectó la presencia de microorganismos anaerobios esporulados, tanto en la leche como en el queso (FIGURA 11), ya que en las restantes fechas, existió una reducción a niveles no detectables de esporas (NMP < 3 esporas / g ó ml) (ANEXOS 2.1, 4.1 y 5.1).

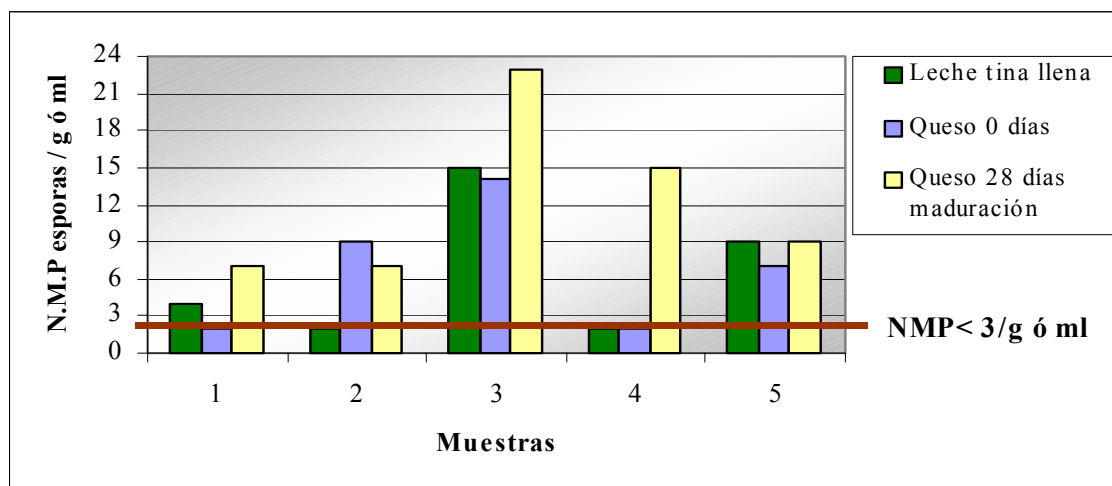


FIGURA 11 N.M.P de bacterias anaerobias esporuladas durante la elaboración del queso tipo Gouda (se presentan los resultados de las 5 muestras de la primera fecha de elaboración)

4.8 Presencia de *E. coli* y *S. aureus* en diferentes puntos de la línea de producción del queso tipo Gouda

Se determinó la presencia de *E. coli* y *S. aureus* en distintos puntos de elaboración de queso tipo Gouda. En la FIGURA 12 se presentan los resultados de *E. coli*. Se aprecia que, la presencia de *E. coli* aumentó a medida que se avanzaba en la línea de elaboración

del queso, detectándose un 8% de muestras con *E. coli* en la leche pasteurizada, alcanzando un 64% en el queso a la salida de prensa. Sin embargo, a partir del queso con cero días de maduración se observó una reducción del porcentaje de presencia de *E. coli*, llegando a un 44 % en el queso con 28 días de maduración (ANEXOS 2.1, 3.1, 4.1, 5.1, 7, 8 y 9.1).

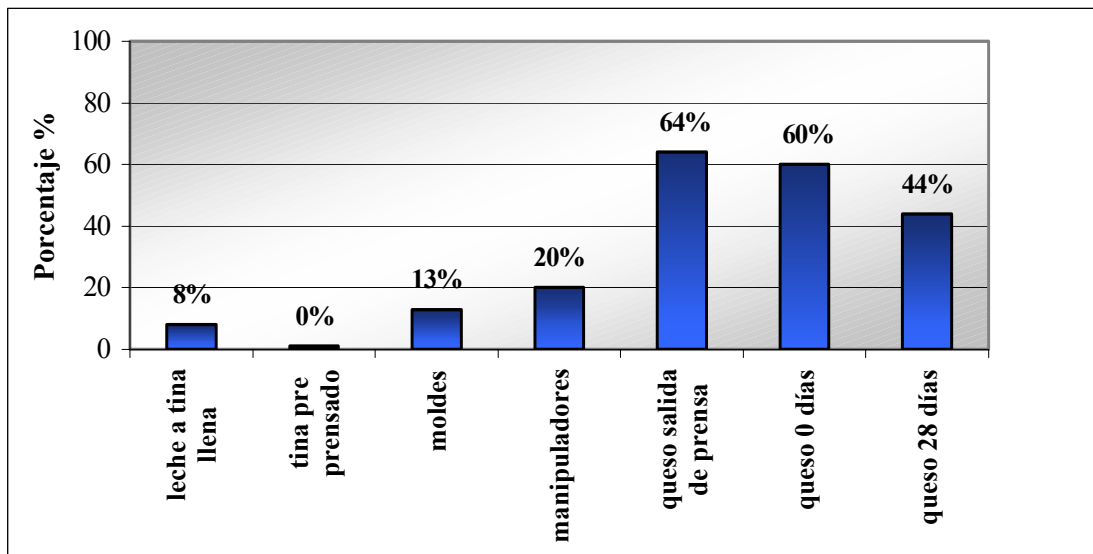


FIGURA 12 Presencia de *E. coli* en distintos puntos de la línea de producción del queso tipo Gouda

Los resultados sobre la presencia de *S. aureus* en la línea de elaboración de queso, se presenta en la FIGURA 13. Se observa que la leche pasteurizada presentó un 16% de presencia de esta bacteria, posteriormente esta aumentó a un 24% en el queso con cero días de maduración, manteniéndose constante la presencia de *S. aureus* en el queso con 28 días. Sin embargo, el mayor porcentaje de muestras con presencia de esta bacteria lo aportaron las manos de los manipuladores, con un 90% de cepas coagulasa positivas (ANEXOS 2.1, 4.1, 5.1 y 7).

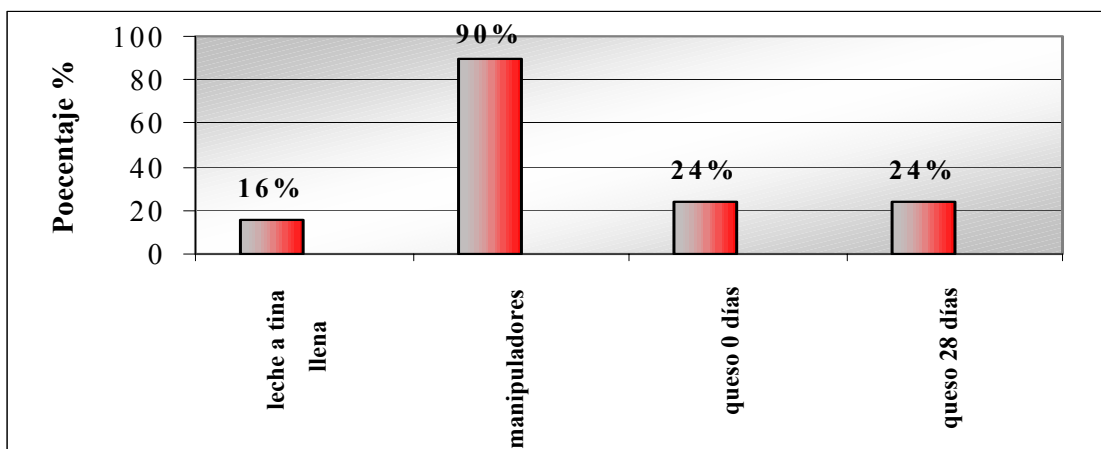


FIGURA 13 Presencia de *S. aureus* en distintos puntos de la línea de elaboración de queso tipo Gouda.

4.9 Control del agua utilizada en la Planta

En el CUADRO 10 se presentan los resultados del N.M.P de coliformes totales y fecales realizado en el agua para lavado de equipos. Sólo en la quinta fecha se detectó presencia de estas bacterias. Cabe destacar además, que sólo a partir de la segunda fecha se realizó este análisis. Los resultados del análisis de agua del lavamanos de la sala de proceso y en el laboratorio de la planta dieron resultados negativos.

CUADRO 10 N.M.P de coliformes totales y fecales en el agua para lavado de equipos

Fechas de elaboración	Coliformes totales	Coliformes fecales
2	N.M.P < 3 / 100 ml	N.M.P < 3 / 100 ml
3	N.M.P < 3 / 100 ml	N.M.P < 3 / 100 ml
4	N.M.P < 3 / 100 ml	N.M.P < 3 / 100ml
5	N.M.P > 1.100 / 100ml	N.M.P > 1.100 / 100ml

Los resultados del contenido de cloro en muestras de agua de llave de distintos puntos de la sala de proceso se presentan en el CUADRO 11. Este análisis fue realizado a partir de la tercera fecha de muestreo.

CUADRO 11: Contenido de cloro residual en distintos puntos de la sala de proceso

Fechas de elaboración	Hora	Lugar	Cloro residual (ppm) (DPD)
(3° fecha) 21 - 01- 02	07:50	Lavamanos sala proceso	0,00
	10:10	Agua para equipos	1,30
	10:35	Lavamanos sala proceso	0,60
	12:30	Laboratorio	0,10
	13:15	Laboratorio	0,30
(4° fecha) 05- 02 - 02	07:50	Lavamanos sala proceso	0,15
	10:00	Agua para equipos	0,25
	11:00	Agua para equipos	0,25
	12:35	Lavamanos sala proceso	0,20
(5° fecha) 26- 02 - 02	08:30	Lavamanos sala proceso	0,10
	10:00	Agua para equipos	0,10
	11:00	Agua para equipos	0,10
	13:00	Lavamanos sala proceso	0,15

De este cuadro se desprende que en la tercera fecha de elaboración, durante el día, hubo una disminución del cloro residual. En cambio en la cuarta fecha se observó un aumento en la concentración del cloro residual. En la quinta fecha se observó niveles bajos de cloro residual, siendo éstos de 0,1 ppm, manteniéndose constante durante las horas de elaboración. La quinta fecha no cumplió con la Norma Chilena de Agua. Nch N° 409/1 (CHILE, INN, 1984), que establece una concentración mínima de cloro de 0,20 ppm en cualquier punto de la red de agua.

4.10 Valores de pH durante la elaboración de queso tipo Gouda

En la FIGURA 14 se presentan los resultados de los valores de los promedios de cinco determinaciones de pH tomados en diferentes etapas del proceso. Se observa que el pH más alto en la leche pasteurizada a tina llena fue de 6,79, encontrándose en la primera fecha de elaboración, en cambio, el valor más bajo se encuentra en la tercera fecha con un pH de 6,66. Cabe destacar que sólo en la tercera fecha de elaboración los valores de pH en el queso presentó un desarrollo de pH correspondiente a cada etapa en el proceso, donde se aprecia un descenso de pH en el queso a la salida de prensa alcanzando valores normales con un valor promedio de 5,85, posteriormente el promedio pH al tiempo cero es de 5,22 y finalmente se observa un aumento de pH con un promedio de 5,31 (ANEXO 11).

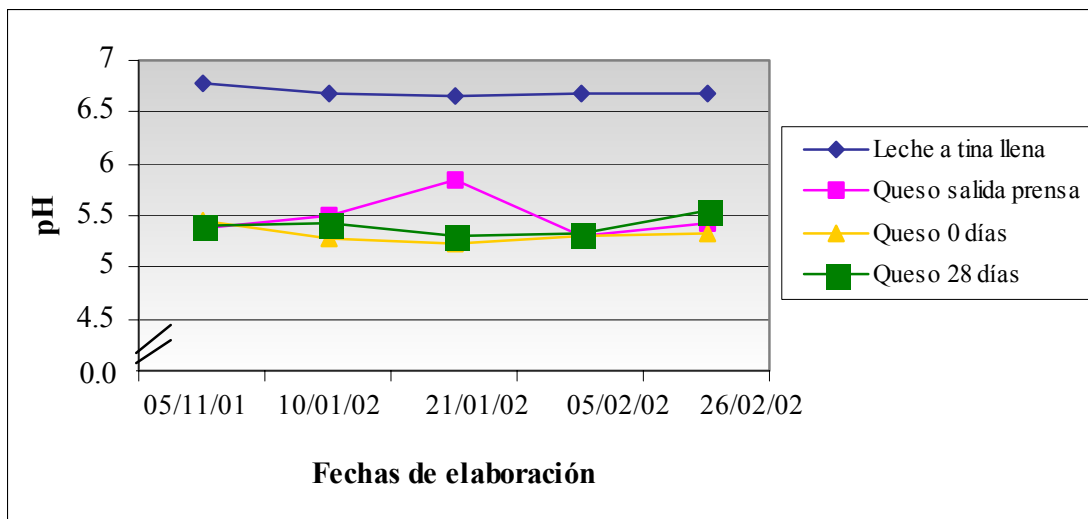


FIGURA 14 Valores de pH de leche y queso por fecha de elaboración en diferentes puntos de la línea de producción

4.11 Temperaturas y humedad determinados en distintas áreas de la planta de proceso

Los valores de temperaturas y humedad determinados en diferentes secciones de la planta, por fechas de elaboración, como: sala de proceso, sala de pre maduración y salas de maduración, se presentan en el ANEXO 12. Cabe destacar que las temperaturas de la sala de maduración fluctuaron entre 4,5°C a 9,0 °C con un rango de humedad relativa entre 57% a 81%. Por otro lado, en la sala de proceso las temperaturas fluctuaron entre 25° a 28°C, mientras que la sala de pre maduración presentó una temperatura de $\pm 13^{\circ}\text{C}$.

5. DISCUSIÓN

El recuento de la flora aerobia mesófila puede proporcionar una información valiosa como indicador de la calidad higiénica de productos lácteos. La leche siempre contiene una serie de microorganismos que pueden variar desde 10^3 a 10^6 ufc/ml, dependiendo de las condiciones higiénicas mantenidas durante su obtención. Cifras superiores a 10^5 ufc/ml, indican que la manipulación en la producción ha sido de mala calidad, mientras que cifras inferiores a $1,1 \times 10^2$ ufc/ml demuestran que la manipulación e higiene fueron adecuadas (PELAEZ, 1985; MELGAR, 1990).

Con la pasteurización se logra una leche más uniforme desde el punto de vista bacteriológico. La flora microbiana original se reduce considerablemente con el tratamiento térmico, constituyendo esta leche un medio más adecuado para las bacterias lácticas que se adicionan como cultivos, ya que no ocurre un alto nivel de competencia con otras bacterias (FAO, 1983). Sin embargo, en este estudio, de un total de 25 muestras de leche pasteurizada en cinco fechas de elaboración distintas, el 84% (21 muestras), no cumplió con lo especificado por el Reglamento Sanitario de los Alimentos (R.S.A) (CHILE, 2000), que establece un valor máximo de 5×10^4 ufc/ml para bacterias mesófilas. Esto pudo deberse, según lo observado en planta, a la mezcla de leche cruda almacenada del día anterior y la recepcionada en el día de elaboración, por lo que pudo sumarse además, la mezcla de leche proveniente de tarros lecheros y de camiones, almacenando la materia prima en cilos a una temperatura de 10°C aproximadamente, temperatura necesaria para la proliferación de microorganismos, lo que puede conducir a una contaminación elevada en la materia prima. Por otro lado pudo haber afectado, las altas temperaturas presentadas en la época de verano, afectando la conservación de la leche de tarros. Esto concuerda con PELAEZ (1985), que señala que recuentos altos de la flora aerobia mesófila en leche pasteurizada, pueden deberse a una contaminación

excesiva de la materia prima y a una elevada proporción de microorganismos termorresistentes, o bien a un tratamiento térmico insuficiente o una recontaminación posterior al tratamiento térmico. Esto se ve reflejado también, en los recuentos obtenidos de enterobacterias en la leche pasteurizada y queso, donde se observó un aumento de estos microorganismos al transcurrir el estudio. Por otro lado, ello indica que, al partir la elaboración del queso con una leche contaminada, se tendrá una mayor competencia entre el cultivo y las bacterias contaminantes, y por ende se obtendrá un producto final con recuentos altos de bacterias contaminantes.

Uno de los defectos que se puede presentar en los quesos durante su elaboración es la hinchazón temprana y tardía. En este estudio, existió una reducción en la presencia de microorganismos anaerobios esporulados, a niveles no detectables de esporas (NMP < 3 esporas / g ó ml) en los meses de verano. Esto coincide con DOYLE **et al.** (1997), quienes señalan que el contenido de bacterias formadoras de esporas en leche cruda varía estacionalmente. Los niveles de *Clostridium* spp, y *Bacillus* spp. son más bajos durante el verano, donde la alimentación es mayoritariamente de praderas. Además estudios realizados por Stadhouders citado por DOYLE **et al.** (1997), determinaron que en Holanda, en invierno, la contaminación por esporas de clostridios en leche sobrepasa el nivel crítico establecido en ese país que es de 5 a 10 esporas/l. El mismo autor señala que en ese país, la contaminación en verano en la leche varía entre 200 a 1000 esporas/l y en invierno 2.000 a 20.000 esporas/l.

Los criterios de clasificación de leche cruda, según el contenido de esporas propuesto por CASADO y GARCIA (1985), señalan que las muestras de este estudio con un N.M.P > 4,0, estarían dentro de la clasificación de una leche de mala calidad. En cambio, las muestras que presentaron un N.M.P entre 1 a 4 esporas/ml se considera una leche contaminada. HULL **et al.** (1992), señalan, que el número de esporas de *C. tyrobutyricum* necesarias para causar hinchazón tardía en queso Suizo y variedades de queso Gouda es de 1 a 5 esporas/ml. Según ello, todas las muestras provenientes de la primera fecha de elaboración, presentan el contenido de esporas suficientes para causar el defecto de hinchazón tardía. Sin embargo, estas muestras no presentaron este defecto.

URIBE (2002), por otro lado encontró que, temperaturas de almacenamiento de 16°C y una concentración de 0% de nitrato de sodio, favorecen el desarrollo de los clostridios en el queso. Debido a que las temperaturas de almacenamiento de los quesos en la industria de este estudio fluctuaron entre los 4,5 a 9,0 °C, estarían por debajo de lo señalado para causar algún defecto en los quesos, ya que especies de *Clostridium* spp. crecen mejor en un rango de temperatura de 20 °C a 24 °C. Además cabe señalar que, en los quesos de este estudio se adicionó nitrato durante su elaboración. Por lo tanto a temperaturas inferiores a 9 °C, las esporas de clostridios no son capaces de germinar, necesitando una temperatura ≥ 12 °C (URIBE, 2002).

El resultado del análisis de varianza de los recuentos de enterobacterias en quesos, entre la salida de prensa y día cero de maduración, arrojó, que no existían diferencias significativas entre las muestras provenientes de estas dos etapas ($p > 0,05$) de una misma fecha de elaboración. Sin embargo, entre las fechas de elaboración, los recuentos microbiológicos presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Ello indicaría que las condiciones higiénicas durante la elaboración no estarían bajo control.

En el presente estudio, se presentó una disminución de los recuentos de enterobacterias entre el queso con cero días de maduración y el producto terminado, para las fechas de elaboración cuarta y quinta, observándose un mayor descenso en los recuentos de enterobacterias en la quinta fecha, con una disminución de 2,0 ciclos log a los 28 días. En un experimento realizado por SANCHEZ **et al.** (1993), en quesos de leche de oveja, los recuentos de enterobacterias entre el día cuarto y 20 de maduración, presentaron una reducción de 0,5 ciclos de logaritmo. Presentándose por lo tanto, en este estudio una mayor reducción de enterobacterias. IDF/FIL (1980), indica que la tasa de muerte de algunos microorganismos en el queso durante la maduración puede ser influenciada por los diferentes cultivos lácticos usados, los cuales los inhiben, debido a la producción de ácido y la consecuente baja de pH, parámetro que pueden ayudar a controlar el crecimiento de los microorganismos (SCOTT, 1991).

El 40 % de las muestras de queso con 28 días de maduración, cumplieron con la especificación señalada por el R.S.A. (10^3 ufc/g). Estas muestras provenían de la

segunda y tercera fecha de elaboración. Al inicio de la maduración estos quesos presentaron valores de pH normales, con un valor promedio de 5,22 para este tipo de queso. Ello, concuerda con MAYORAL *et al.* (1991), quienes, señalan que los resultados de los recuentos de enterobacterias, pueden estar relacionado con el valor de pH al principio de la maduración, ya que a valores de pH bajos 5,15, los recuentos de enterobacterias son bajos, lo que concuerda con el presente estudio, ya que el queso que presentó recuentos altos de enterobacterias, presentó valores más altos de pH.

Los recuentos de enterobacterias en este trabajo, en quesos a los 28 días, presentaron variaciones entre log 1,37 a 3,67 ufc/g. Sin embargo, se obtuvieron valores que sobrepasaron lo aceptado por la normativa chilena. TAVARIA y MALCATAR (1998), realizaron un estudio en quesos con leche de oveja, donde obtuvieron valores elevados de log 6,0 a log 8,5 ufc/g en quesos con 18 días de maduración. Estos autores atribuyen los altos recuentos de enterobacterias a condiciones higiénicas deficientes durante la colección y manipulación de la leche. En el presente estudio los recuentos de enterobacterias fueron más bajos, que los encontrados por estos autores, lo cual pudo deberse a que los quesos de este estudio, permanecieron por más tiempo en las salas de maduración (28 días), que los quesos elaborados con leche de oveja (18 días), con lo cual se redujo la población de enterobacterias.

Los quesos en las cámaras de maduración se mantuvieron a temperaturas comprendidas entre 4,5 y 9,0°C, con una humedad relativa entre 57 y 81%. ROBINSON (1987), señala que los quesos se deben mantener a temperaturas aproximadamente entre 4,0 y 14°C con una humedad relativa entre 86 y 88%. Las temperaturas durante el estudio por lo tanto, se mantuvieron dentro del rango señalado. Sin embargo, los quesos de la cuarta y quinta fecha de elaboración fueron madurados a 6°C. A esta temperatura la maduración se hace más lenta, por lo tanto se necesita más tiempo para que los quesos alcancen una maduración adecuada. Además, en la cuarta y quinta fecha se obtuvieron los recuentos más altos de enterobacterias, lo que indica que probablemente la lactosa no fue fermentada lo suficiente por los cultivos lácticos y la producción de ácido láctico fue baja para inhibir a los microorganismos contaminantes durante la maduración. Los

valores del porcentaje de humedad relativa en las cámaras de la industria, fue más bajo de lo especificado por ROBINSON (1987). Sin embargo, según este autor no es necesario controlar la humedad en las cámaras, ya que el queso Gouda es envasado al vacío y no está expuesto a la atmósfera de la sala. Con el vacío se elimina el aire evitando así la pérdida de humedad y el crecimiento de mohos en la superficie del queso.

El INSTITUTE OF FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY (I.F.S.T.), (1997), señala que las buenas condiciones de higiene deben ser mantenidas durante la producción del queso, para prevenir una contaminación post pasteurización. Según la clasificación de recuento de bacterias mesófilas en superficies limpias de equipos lácteos, ROBINSON (1987), establece que con un recuento mayor a $0,5 \text{ ufc/cm}^2$, no son satisfactorias las condiciones de higiene, situación que sucedió en las superficies de los moldes, al igual que en las superficies del fondo y los costados de la tina de pre prensado. Para cumplir con una higiene satisfactoria, los recuentos de bacterias mesófilas en los equipos deberían haber arrojado valores menores a $0,1 \text{ ufc/cm}^2$. Los costados de la tina presentaron recuentos altos de enterobacterias, al igual que en los moldes de la cuarta fecha. Por lo tanto, esto podría indicar que en las fechas de elaboración que presentaron quesos con elevados recuentos de enterobacterias, y que no cumplieron con la normativa, es probable que no se cumplieron las buenas condiciones de limpieza. Por otro lado, se podría haber sumado a la contaminación, la presencia de manipuladores portadores de enterobacterias, *E. coli* y *S. aureus* en sus manos.

Según la clasificación de ROBINSON (1987), para el recuento microbiano del aire en el área de proceso de quesos madurados, todos los sectores muestreados de la planta presentaron recuentos bajos de bacterias, mohos y levaduras, por lo tanto se clasificaría la sala de proceso con un aire de buena calidad. Por otro lado, la humedad relativa de la sala de proceso de todas las fechas de elaboración, exceptuando la segunda fecha, estarían por debajo del 95% de H.R recomendado por este autor.

Los valores promedios de pH determinados en la leche pasteurizada a tina llena estarían dentro del rango de pH 6,6 a 6,8, especificado por FAO (1983) y ALAIS (1985), para

ser considerada como una leche apta para su utilización. El pH de la leche representa la acidez actual de ésta y de ello dependen propiedades tan importantes como la estabilidad de la caseína.

En un estudio de queso tipo Gouda realizado por NIKLITSCHK (1997), se señaló un valor promedio de pH para el queso a la salida de prensa e inicio de maduración de 5,74 y 5,22, respectivamente. En este estudio, sólo la tercera fecha de elaboración se acercó a los valores especificados por este autor, donde se observó un descenso de pH de 5,85 a 5,22. Sin embargo, el pH de las restantes muestras a la salida de prensa estuvieron por debajo del valor de 5,74. El descenso del pH inhibe muchas bacterias contaminantes, por lo tanto, es muy importante una acidificación efectiva y alta (FAO, 1983). Por otro lado, BACHMANN y SPAHR (1995), han reportado la sobrevivencia de microorganismos en queso por un valor de pH no adecuado después del prensado.

A medida que se avanzó en la línea de elaboración del queso tipo Gouda, se observó un aumento en la presencia de *E. coli*, encontrándose en la leche pasteurizada en un 8% de las muestras. COSENTINO y PALMAS (1997), señalan que la presencia de *E. coli* en leche pasteurizada se debe probablemente a fallas ocurridos durante el tratamiento térmico. Otra de las fuentes de contaminación de *E. coli*, según BASTIAN y SIVELA (2000), pueden ser derrames de leche o el contacto con superficies con leche cruda. Por lo tanto, para prevenir una contaminación se recomienda, separar las áreas de leche cruda con la leche pasteurizada.

La presencia de *E. coli* en quesos se pudo deber a una contaminación posterior al tratamiento térmico de la leche y a una deficiente higiene durante la producción, lo que concuerda con COSENTINO y PALMAS (1997). Además, esto se ve reflejado en la presencia de un 64% de *E. coli* en los quesos a la salida de prensa y un 44% de *E. coli* en los quesos a los 28 días de maduración. La contaminación pudo ser producto de la mala higiene de los moldes, ya que estos aportaron un 13% de *E. coli* y los manipuladores contribuyeron con un 20 %. Esta contaminación se podría deber, a que el moldeo y el prensado fueron realizados sin el debido cuidado, con lo cual los granos de la cuajada

podieron quedar mal soldados y con la presencia de agujeros dentro de los cuales se acumuló suero, que fue foco inmediato de una intensa proliferación microbiana (SORDO, 1983). El agua, es otro parámetro fundamental ya que debe estar exenta de microorganismos de origen fecal, situación que no se presentó en la quinta fecha de elaboración, donde se detectó un NMP > 1.100 de coliformes fecales/100 ml, y el contenido de cloro residual estaba bajo los límites de 0,2 ppm, establecidos por la norma chilena de agua.

En un estudio realizado por BACHMANN y SPAHR (1995), en quesos de pasta semi dura se observaron resultados similares para *E. coli* a los de este estudio. Estos autores encontraron recuentos cercanos a log 6 ufc/ml en la leche con un aumento en los recuentos a log 7 ufc/ml en la cuajada después de la cocción, posteriormente una disminución de *E. coli* a los 30 días de maduración a niveles no detectables. La bacteria no fue detectada a los 60 días de maduración. Por ello, también se podría esperar que *E. coli* muera en los quesos tipo Gouda de este estudio, a medida que transcurre el tiempo de maduración y no sea detectado. Estos autores también señalan que la rápida producción de ácido es el principal factor responsable de la eliminación de microorganismos de un queso de pasta semi dura.

Un 16% de las muestras de leche pasteurizada presentaron *S. aureus*, esta bacteria pudo haber tenido su origen en leche con presencia de mastitis. Donde JOHNSON **et al.** (1990), señalan que el control de la mastitis y un pronto tratamiento térmico de la leche, reducen el riesgo de tener un alto recuento de *S. aureus* y producir alguna enfermedad. En este estudio, se mantuvo la presencia de cepas coagulasa positiva en un 24%, entre el queso con cero y 28 días de maduración. IDF/FIL (1980), señala que la temperatura de cocción, cantidad del cultivo inoculado y edad de éste, influye sobre el crecimiento de *S. aureus* durante la elaboración del queso. Además, con un control estricto en el pH de la cuajada, y el uso de cultivos lácticos apropiados, se logra un control en el crecimiento y producción de enterotoxinas por *S. aureus* (BOWEN y HENNING, 1994). Sin embargo, lo que pudo haber favorecido la presencia de la bacteria en el producto terminado fue la concentración inadecuada de sal, y el tiempo de maduración.

Un queso Gouda elaborado con leche cruda con recuentos de *S. aureus* del orden de $10^2 - 10^3$ ufc/ml, puede llegar hasta $10^4 - 10^5$ ufc/g en 24 h, incluso en condiciones normales de acidez. La velocidad de destrucción de este patógeno en este queso es función de la cepa del cultivo iniciador y se necesitan elevados recuentos de estafilococos, del orden de 10^8 ufc/g de queso para poder detectar enterotoxinas suficiente para que se produzca el cuadro (ROBINSON, 1987). Por su parte, JOHNSON **et al.** (1990), estimaron que aproximadamente un millón de *S. aureus*/g son requeridos para producir enterotoxinas en quesos y atentar contra la salud del consumidor. Para esto se requiere de una población inicial en leche de $10^2 - 10^9$ / ml.

Los manipuladores, en este estudio, fueron la mayor fuente de contaminación por *S. aureus*, ya que el 90% de los manipuladores resultaron portadores de *S. aureus*. Este elevado porcentaje se debe a que los manipuladores poseían heridas en sus manos y no utilizaban guantes, teniendo contacto directo con el producto. Ello se vio reflejado en el incremento de *S. aureus* en la línea de proceso, ya que el 24% de las muestras de queso con cero y 28 días de maduración presentaron la bacteria. Por lo tanto, los manipuladores de esta empresa, no estarían cumpliendo con lo estipulado por el CODEX (1999) y la IDF/FIL (1990), que señalan que los operarios con lesiones deben emplear guantes de un solo uso, para reducir la contaminación por *S. aureus*.

Para obtener un producto de buena calidad microbiológica y para que éste presente seguridad para su consumo, es necesario contar con una materia prima de buena calidad y un control adecuado de ésta, ya sea exigiendo en planta, leche con bajos niveles de microorganismos y una temperatura de almacenamiento que no sobrepasen los 4°C, Además deberá asegurarse una manipulación adecuada por parte de los operarios, con la utilización de guantes cuando éstos presentes heridas. Por otro lado, el agua deberá ser de calidad potable, con una cloración adecuada para inhibir el crecimiento de *E. coli*. Además deberá, implementarse sistemas de limpieza e higienización para asegurar que las superficies de equipos, moldes y tinas, no sean una vía de contaminación hacia el producto y así poder minimizarlas al máximo. Es por ello, y debido a los puntos tratados en la presente investigación, se acepta la hipótesis planteada.

6. CONCLUSIONES

- Los puntos identificados como de mayor riesgo de contaminación microbiológica en la línea de proceso del queso tipo Gouda fueron: la leche pasteurizada en tina llena, las manos de los manipuladores y la tina de pre prensado.
- Un 84% de las muestras de leche pasteurizada en tina utilizada para la elaboración de queso y un 60% de los quesos con 28 días de maduración no cumplieron con las especificaciones del Reglamento Sanitario de los Alimentos (CHILE, 2000).
- En un 24% de los quesos con 28 días de maduración se detectó la presencia de *S. aureus* y en un 44% de ellas se observó la presencia de *E. coli*.
- La mayor fuente de contaminación de *S. aureus* fue aportada por las manos de los manipuladores, debido a que un 90% de éstos, son portadores de la bacteria. Se detectó además, un efecto acumulativo de la presencia de *E. coli*, en distintos puntos a través de la línea de proceso.
- Solamente en una fecha de elaboración se detectó una cantidad de esporas anaerobias esporuladas en leche y queso suficientes, para causar el defecto de la hinchazón tardía.
- Hubo una reducción en los recuentos de enterobacterias de un 36% entre el queso con cero y 28 días de maduración, sin embargo, la presencia de *E. coli* solo se redujo en un 16% durante el mismo periodo.
- Todos los recuentos de bacterias en superficies de moldes y tina de pre prensado fueron superiores a $0,5 \text{ ufc/cm}^2$, parámetro no satisfactorio para superficies limpias.

7. RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo identificar los puntos de contaminación microbiológica durante el proceso de elaboración del queso tipo Gouda y determinar la calidad microbiológica del producto terminado. El trabajo fue realizado en una empresa de la décima región.

Para esta investigación se tomaron muestras de leche pasteurizada a tina llena, de queso a la salida de prensa y del queso en el día cero y con 28 días de maduración, según el método IDF/FIL N° 50C. Se muestrearon además, las manos de manipuladores, superficies de la tina del pre prensado y moldes de quesos, mediante la técnica de la tórula. Para el control del ambiente se dejó una placa petri/15 min expuestas en diferentes puntos de la sala de proceso. Se tomaron muestras en 5 fechas de elaboración diferentes, con 5 muestras de leche y 5 muestras de queso, a los 0 y 28 días de maduración. A las muestras se le realizaron los análisis de recuento de bacterias mesófilas, enterobacterias, detección de *E. coli* y *S. aureus* y NMP de microorganismos anaerobios esporulados. Los resultados mostraron que un 84% de las muestras de leche pasteurizada y un 60% de los quesos con 28 días de maduración no cumplieron con las especificaciones del Reglamento Sanitario de los Alimentos. Se detectó un efecto acumulativo en el porcentaje de *E. coli* a medida que se avanzaba en la línea de proceso. La mayor fuente de contaminación de *S. aureus* fue aportada por las manos de los manipuladores, siendo un 90% de éstos, portadores de la bacteria. En la superficie de los moldes y tina de pre prensado predominaron los recuentos de bacterias mesófilas superiores a $0,5 \text{ ucf/cm}^2$, considerado como un grado de higiene no satisfactorio. Se concluyó que los principales puntos de contaminación microbiológica durante el proceso de elaboración del queso tipo Gouda fue la leche pasteurizada, las manos de los manipuladores, y la tina de pre prensado. Además se observó una reducción en un 36% en los recuentos de enterobacterias entre el queso al día cero y 28 días de maduración, y una reducción del 16% de *E. coli* en este mismo periodo.

SUMMARY

The objective of this study was, to identify the microbiological contamination points during the manufacturing process of Gouda cheese and to determine the microbiological quality of finished product. The study was carried out at company of the region tenth.

For the study, pasteurized milk samples were taken before entering the cheese vat and cheese samples were taken at day zero and after 28 days of ripening, according to the FIL/IDF N° 50C method. Also samples from, the hands of the foodhandlers, the surface of the pre-press vat and the cheese moulds were obtained, with the swab technique. For the environmental control, a Petri plate was left for 15 minutes, exposed in different points of the processing room. Samples were taken at five different manufacturing days, with five milk samples and five cheese samples taken at day zero and after 28 days of ripening. Counts of mesophilic bacteria, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and MPN of anaerobic sporeforming bacteria, were determined.

The results showed that a 84% of the pasteurized milk samples and 60% of the 28 days ripened cheese, did not meet the specifications of the Chilean Food Health Regulation. An accumulative effect was detected in the percentage of *E. coli* along the processing line. The major source of *S. aureus* contamination was detected on the foodhandler's hands, with 90% of them being carriers of the bacterium. On the surface of the moulds and pre - press cheese vat, the mesophilic bacterial counts were above 0,5 ucf/cm², which was considered as a non satisfactory hygienic level.

It was concluded that the main microbiological contamination points during the Gouda cheese manufacturing process were, the pasteurized milk, the foodhandler's hands and the pre - press vat. A reduction in the counts of *Enterobacteriaceae* was found between the day zero cheese and the 28 days ripened cheese, and a reduction of 16% of *E. coli* in this same period.

8. BIBLIOGRAFÍA

- AGÜERO, E., PEDRAZA, C. y GODOY, S. 1987. Calidad higiénica del agua y su relación con el contenido microbiano de la leche. *Agricultura Técnica*, 47 (2): 136 – 141
- ALAIS, CH, 1985. *Ciencia de la Leche. Principios de Técnica Lechera* 2da. ed. Reverté, Barcelona. 872 pp.
- (APHA) AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1992. *Standard methods for the examination of dairy products*. Robert T. Marshall, (Editor). 16th ed., Washington D.C., 546 pp.
- BACHMANN, H. y SPAHR, U. 1995. The fate of potentially pathogenic bacteria in Swiss hard and semihard cheese from raw milk. *Journal of Dairy Science*, 78: 476 – 483.
- BASTIAN, S., y SIVELA, S. 2000. *Escherichia coli* 0157: H7. Aspects of concern to the dairy industry. *Bulletin of the IDF*, 137: 58 - 62
- BOURGEOIS C.M, MESCLE J.F, y ZUCCA J., 1994. *Microbiología alimentaria*. Vol. 1. Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. España. 537 pp.
- BOWEN, D., y HENNING, D. 1994. Coliform bacteria and *Staphylococcus aureus* in retail natural cheese. *Journal of Food Protection*, 57 (3): 253 – 255.
- BRITO, C., 1982. *Fundamentos químicos y microbiológicos en elaboración de quesos*. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 17 pp.

BRITO, C., 1993. Aspectos bioquímicos de la maduración de quesos (1). Alimentos, 18 (4): 40, 49 – 55.

BRITO, C., MORALES, O., MOLINA, L., PESSOT, R. y PINTO, M. 1995. Evolución de la maduración de queso chanco tipo campo almacenado a altas temperaturas. Parte 1. Parámetros fisicoquímicos y pérdida de peso. Agro Sur 23 (2) : 95 – 105.

CASADO, C.P, y GARCIA, A. J. 1985. La calidad de la leche y factores que la influyen. Industrias Lácteas Españolas, 81: 298 pp.

CHILE. Ministerio de Salud. 2000. Reglamento Sanitario de los Alimentos. Decreto Supremo N° 977. Ediciones Publiley. Santiago. Chile. 207 p.

CHILE. INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. 1979. Norma Chilena, Nch 1671. Determinación de pH. Santiago. 5 p.

_____. _____. 1984. Norma Chilena, NCh 409/1. Agua potable. Parte 1: Requisitos. Santiago. 10p.

_____. _____. 1984. Norma Chilena, NCh 409/2. Agua potable. Parte 2: Muestreo. Santiago. 10p.

_____. _____. 1999. Norma Chilena, NCh 2478. Productos lácteos – Queso Gouda - Requisitos. Santiago. 5 p.

CODEX ALIMENTARIUS. 1999. Higiene de los alimentos. Textos Básicos. Publicado por la Secretaría del programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, FAO, Roma. 74 pp.

_____. 2000. Leche y productos lácteos. 2ª Edic. Vol 12. Publicado por la Secretaría del programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, FAO,

Roma. 130 p.

- COSENTINO S, y PALMAS F,. 1997. Hygienic conditions and microbial contamination in six ewe's-milk-processing plants in Sardinia, Italy. *Journal of Food Protection* 60 : 283 - 287
- COUSIN, M. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy product: A review. *Journal of Food Protection*, 45: 172 – 207.
- CRAVEN, M. 1992. Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage 1. Identification of types. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 47 (1): 38 - 42
- CROMIE, S. 1992. Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 47 (7): 96-99.
- DASGUPTA, A. y HULL, R. 1989. Late blowing of Swiss cheese: Incidence of *Clostridium tyrobutyricum* in manufacturing milk. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 44 (2): 82 – 87.
- DODD, F. 1987. Milk hygiene and the control of udder disease. *Bulletin of the International Dairy Federation* 221: 28 – 31.
- DOYLE, M., BEURHAT, L. y MONTVILLE, T. 1997. *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. Editorial Washington D.C. 768 p.
- DURAN, C. 1985. Contribución al estudio de tipificación del queso Paipa de Colombia. Valdivia. Tesis Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Centro Tecnológico de la Leche para Chile y América Latina. Magister en Ciencias y Tecnología de la Leche. 252 p.
- ELMER, M. y JAMES, S,. 1998. *Applied Dairy Microbiology*. Editorial Marcel Dekker,

New York. 516 p.

ERKMEN, O. 1995. Behaviour of *Staphylococcus aureus* in Turkish Feta cheese during manufacture and ripening. *Journal of Food Protection*, 58 (11): 1201 – 1205.

EYLES, M. 1992. Raw milk cheese: The issues. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 47 (7): 102 – 105.

(FAO) ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. 1981. Cultivos lácticos y productos lácteos fermentados. Manual correspondiente al módulo III. Productos fermentados y queso. Equipo de fomento y capacitación en lechería de FAO para América Latina. 3.54 p.

_____. 1983. Tecnología y control de calidad de productos lácteos. Manual correspondiente al módulo I. Tecnología y control de calidad de productos lácteos. Equipo de fomento y capacitación en lechería de FAO para América latina. 5.66 p.

FRYER, T. y HALLIGAN, A. 1976. Detection of *Clostridium tyrobutyricum* in milk. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 11:132.

GALESLOOT, T. y HASSING, F. 1983. Effect of nitrate and chlorate and mixtures of these salt on the growth of coliform bacteria. Result of model experiments related to gas defects in cheese. *Netherland Milk Dairy Journal*, 37: 1 – 10.

GARCIA, M., GARCIA, M. y OTERO, A.. 1990. Microorganismos patógenos en el queso. *Industrias Lácteas Españolas*, (142): 97 – 101.

GAYA, P., MEDINA, M. y NUÑEZ, M. 1986. Mejora de la calidad higiénico sanitaria del queso Manchego mediante la optimización de los parámetros de elaboración. *Revista Española de Lechería*, (8) marzo – abril: 31 – 35.

- GEHRIGER, G. 1980. Multiplication of bacteria in milk during farm storage. Bulletin of the International Dairy Federation, 120: 22-24.
- GILLES, J., y FRYER, T. 1984. The effect of storage temperature on “late blowing” in Gouda cheese. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, 19: 83 – 85.
- HARRIGAN, W. y McCANCE, M. 1968. Métodos de laboratorio en microbiología. Editorial Academia León, España. 426 p.
- HAYES, P. 1993. Microbiología e higiene de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 369 p.
- HEIMLICH, W. y CARRILLO, B. 1995. Manual para centros de acopio de leche. Producción, operación, aseguramiento de calidad y gestión. Corporación de Fomento de la Producción (CORFO). Valdivia. Universidad Austral de Chile. Editorial Egall – Master Print Ltda. 166 p.
- HERMAN, L., DE BLOCK, J. y WAES, G. 1995. A direct PCR detection method for *Clostridium tyrobutyricum* spores in up to 100 milliliters of raw milk. Applied and Environmental Microbiology, 61 (12): 4141 – 4146.
- HULL, R., TOYNE, S., HAYNES, I. y LEHMANN, F. 1992. Thermotolerant bacteria: A re – emerging problem in cheesemaking. The Australian Journal of Dairy Technology, 47 (7): 91-94.
- (ICMSF). INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. 1988. Microorganisms in foods. 2^a edición. University of Toronto Press. 436 p.
- (IDF/FIL) INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. 1980. Behaviour of pathogens in cheese. Bulletin of the International Dairy Federation 122: 1- 23.

- _____.INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. 1984. Inspection and sampling procedures for determining the hygienic condition of dairy plant. Bulletin of the International Dairy Federation 121: 1- 4.
- _____.INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. 1987. The use of lysozyme in the prevention of late blowing in cheese. Bulletin of the International Dairy Federation 216: 1- 16.
- _____.INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. 1990. Personnel: Hygiene and health requirements. IDF – FIL 267: 14 – 15.
- _____.INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. 1994. Prevention of microbial contamination and growth. IDF – FIL 292: 17 - 27.
- _____.INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. 1995. Milk and milk products. Guidance on Sampling. IDF – FIL 50 C. 20 p.
- _____.INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. 1997. Management of production environment air. IDF – FIL 324: 61 – 66.
- (I.F.S.T.) INSTITUTE OF FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY. 1997. Food safety and cheese. Food Science and Technology Today, 11, (1): 43 - 45.
- JOHNSON, E., NELSON, J. y JOHNSON, M. 1990. Microbiological safety of cheese made from heat – treated milk, Part II. Microbiology. Journal of Food Protection, 53 (6): 519 – 540.
- JIMENEZ, V. 1989. La hinchazón precoz de los quesos. Industrias Lácteas Españolas, 129: 21 – 22.

- LEHMANN, F., RUSSELL, P., SOLOMON, L. y MURPHY, K. 1992. Bacterial growth during continuous milk pasteurification. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 47 (1): 28 – 32.
- LIMSOWTIN, G. 1992. Inhibition of starter cultures. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 47 (7): 100 – 102.
- MADRID, A. 1989. La composición de la leche y su influencia en la fabricación de quesos. *Industrias Lácteas Españolas*, 125-126: 19 – 23.
- MADRID, R., CENZANO, I. y MADRID, J. 1990. Tratamientos generales de la leche que entra en una quesería (II). *Industrias Lácteas Españolas*, 133: 39, 42 – 43, 46 – 47 pp.
- MADRID, A., 1990. *Manual de Tecnología Quesera*. Ediciones - Mundi - Prensa. España. 335 p.
- MAHECHA, G. 1987. Información técnica: Clasificación de quesos. *Alimentos*, 12 (2): 59 – 61.
- MARTIN, J. 1981. Symposium: Heat resistant microorganisms in dairy food system. *Journal of Dairy Science*, 64 (1): 149 – 155.
- MARTLEY, F. y CROW, V. 1996. Open texture in cheese: the contributions of gas production by microorganisms and cheese manufacturing practices. *Journal of Dairy Science*, 63: 489 – 507.
- MAYORAL, M., GONZALEZ, J. y NIETO, M. 1991. Queso del Casar: Caracterización productiva, físico química y microbiológica. *Archivos de Zootecnia*, 40: 359 – 369.
- MELGAR, F., 1990. Investigación de inhibidores en leche y productos lácteos. *Revista Española de Lechería*, (22): 35 – 39.

- MENDEZ, J., 1987. Importancia de las salmueras en el queso. Industrias Lácteas Españolas. España. 95 – 96 : 61 – 63.
- MORTIMORE S, y WALLACE C. 1996. HACCP. Enfoque práctico. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 291 p.
- MULLAN, M. 2000. Causes and control of early gas production in Cheddar cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 53 (2): 63 – 38.
- NIKLITSCHKEK, L. 1997. Evaluación de ecuaciones predictivas del rendimiento teórico en queso tipo Gouda. Valdivia. Tesis Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Instituto de Ciencias y Tecnología de los Alimentos. Magister en Ciencias y Tecnología de la Leche. 135 p.
- (O.M.S) ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 1964. Normas internacionales para el agua potable. Ginebra. 45 p.
- PASCUAL, E. 1983. Los problemas más frecuentes en la fabricación de queso. *Industrias Lácteas Españolas*, 83 (40): 27 – 36.
- PELAEZ, C. 1985. Control de calidad microbiológico de productos lácteos terminados. *Revista Española de Lechería*, 3 (mayo – junio): 21- 29.
- POBLETE, P. 1998. Eficiencia de lavado e higienización de tarros, estanques de leche, en tres centros de acopio lechero de la provincia de Valdivia. Valdivia. Tesis Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Instituto de Ciencias y Tecnología de la Leche. 80 p.
- POLYCHRONIADOU, A. 2001. Eyes in cheese: a concise review. *Milchwissenschaft*, 56 (2): 74 - 77.

- RAMMER, C. 1996. Quality of grass silage infected with spores of *Clostridium tyrobutyricum*. *Grass and Forage Science*, 51: 88 – 95.
- RIVERA, V. 2001. Prospección de la vida útil en queso Cottage elaborada con cultivos directo y semi – directo y adición de crema con y sin homogeneizado. Tesis Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Ingeniería en Alimentos. 132 p.
- ROBINSON, R. 1987. Microbiología lactológica. Vol. II. Microbiología de los productos lácteos. Editorial Acribia, S.A, Zaragoza, España. 333 p.
- SANCHEZ, R., POULLET, B., CACERES, P. y LARRIBA, G. 1993. Microbiological quality and incidence of some pathogenic microorganism in La Serena cheese throughout ripening. *Journal of Food Protection*, 56 (10): 879 – 881.
- SCOTT, R. 1991. Fabricación de queso. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España. 520 p.
- SORDO, J. 1983. Hinchazón de los quesos, causas y medios para combatirlos. *Industrias Lácteas Españolas*, 51 (33): 58 pp.
- SORIA, R. 1983. Contribución al Estudio de Hinchazón en el Queso Andino en dos Comunidades Rurales de la Región Interandina Central del Ecuador. Tesis Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Centro Tecnológico de la Leche para Chile y América Latina. Magíster en Ciencia y Tecnología de la Leche. 118p.
- SPAHR, U. y URL, B. 1994. Behaviour of pathogenic bacteria in cheese – A synopsis of experimental data. *Bulletin of the International Dairy Federation* N° 298: 2 – 13.
- STADHOUDERS, J y SPOELSTRA, S. 1990. Prevention of the contamination of raw milk by making a good silage. *Bulletin of the International Dairy Federation* N° 251:

24 –34.

SUAREZ, J. y COLOMO, B. 1990. Control de esporulados butíricos. Industrias Lácteas Españolas, (141): 33 – 39.

TAVARIA, F. y MALCATAR, F. 1998. Microbiological characterization of Serra da Estrela cheese throughout its appellation d' Origine Protégée Region. Journal of Food Protection, 61 (5): 601 – 607.

UR – REHMAN, S., MCSWEENEY, P. y FOX, P. 1999. A study on the role of the indigenous microflora of raw milk on the ripening of Cheddar cheese. Milchwissenschaft 54 (7): 388 – 392.

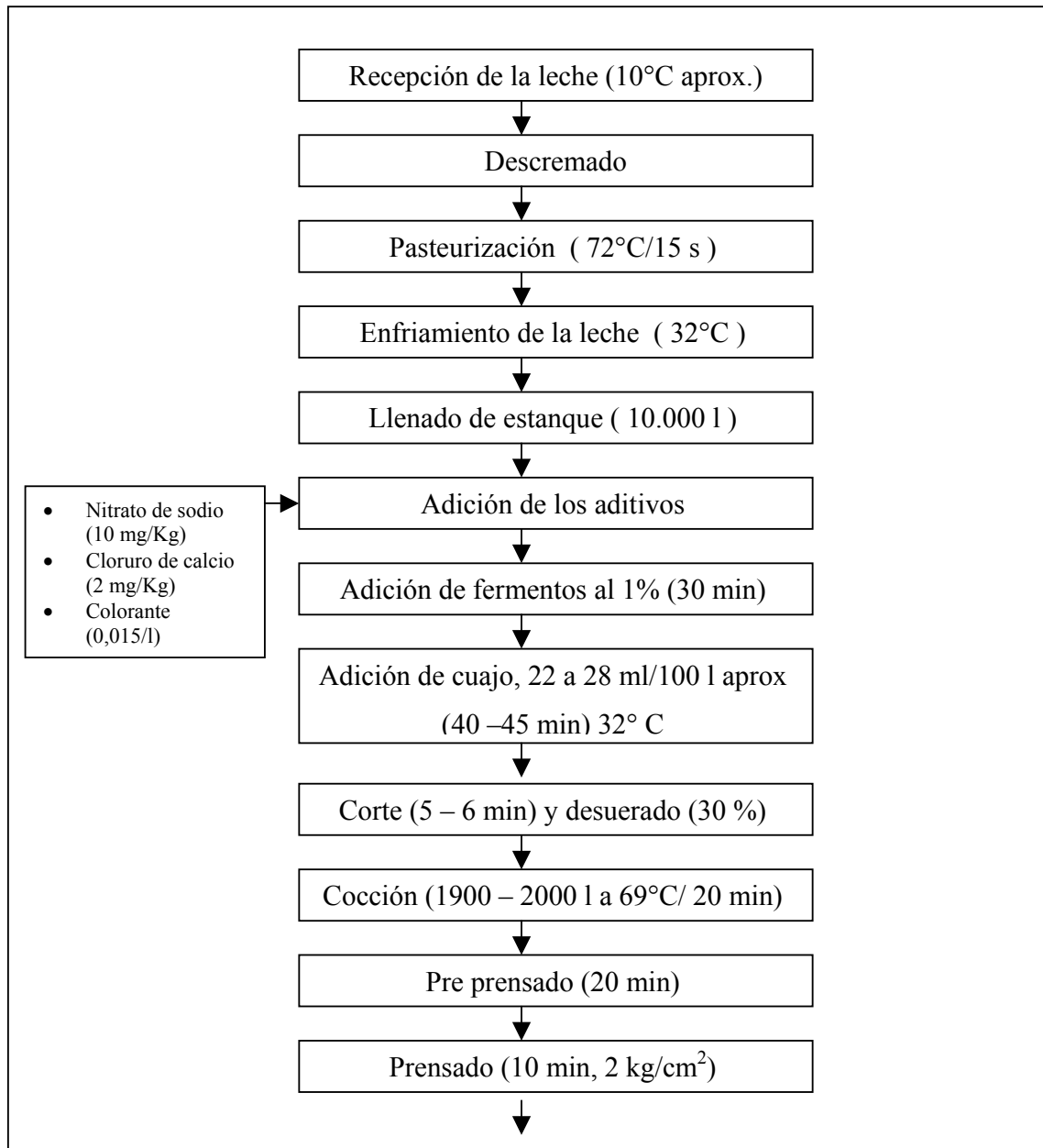
URIBE, C. 2002. Efecto del nitrato de sodio como aditivo en la elaboración de queso tipo Gouda, sobre el contenido de bacterias ácido butíricas. Tesis Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Ingeniería en Alimentos. 85 p.

ZHAO, T., DOYLE, M., ZHAO, P., BLAKE, P. y MAO WU, F.2001. Chlorine inactivation of *Escherichia coli* O 157: H7 in water. Journal of Food Protection, 64 (10): 1607 – 1609.

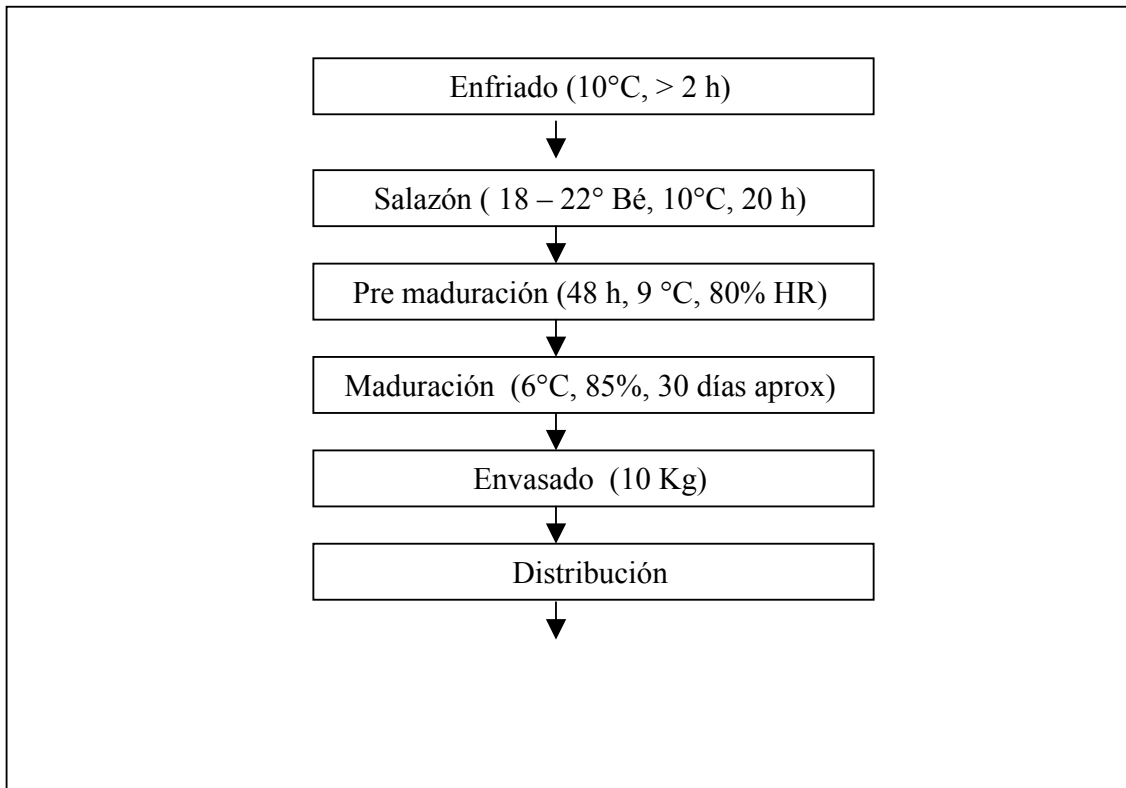
9. ANEXOS

ANEXO 1

DIAGRAMA DE FLUJO DE QUESO TIPO GOUDA DE LA PLANTA.



(Continuación línea de flujo de queso)



ANEXO 2

Leche pasteurizada a tina llena

2.1 Análisis microbiológico por fecha de muestreo.

Fecha Elaboración	Tina	Rcto. bact. mesóf. ufc/ml	Rcto. bact. mesófilas Log ufc/ml	Entero ufc/ml	Enterob Log ufc/ml	N.M.P esporas / ml	<i>Staph. aureus</i>	<i>E.coli</i>
05-11-01	1	$1,1 \times 10^5$	5,04	< 1,0 *	0	4	ausencia	Ausencia
	2	$1,1 \times 10^5$	5,04	< 1,0	0	2 (< 3)	ausencia	Ausencia
	3	$2,7 \times 10^5$	5,43	< 1,0	0	15	presencia	Ausencia
	4	$2,7 \times 10^4$	4,43	< 1,0	0	2	ausencia	Ausencia
	5	$1,2 \times 10^5$	5,07	< 1,0	0	9	ausencia	Ausencia
Prom ± D.est			5,00 ± 0,6		0,0 ± 0,0			
10-01-02	1	$2,2 \times 10^5$	5,34	$5,0 \times 10^1$	1,69	2 (< 3)	presencia	Ausencia
	2	$1,7 \times 10^5$	5,23	< 1,0	0	2 (< 3)	ausencia	Ausencia
	3	$1,5 \times 10^5$	5,18	< 1,0	0	2 (< 3)	ausencia	Ausencia
	4	$1,0 \times 10^5$	5,00	< 1,0	0	2 (< 3)	ausencia	Ausencia
	5	$1,2 \times 10^5$	5,10	< 1,0	0	2 (< 3)	ausencia	Ausencia
Prom ± D.est			5,17 ± 0,13		0,34 ± 0,76			
21-01-02	1	$5,6 \times 10^4$	4,75	$1,0 \times 10^3$	3	2 (< 3)	ausencia	Ausencia
	2	$2,1 \times 10^4$	4,32	$9,0 \times 10^1$	1,95	2 (< 3)	ausencia	presencia
	3	$1,3 \times 10^4$	4,11	$1,0 \times 10^1$	1	2 (< 3)	ausencia	ausencia
	4	$8,6 \times 10^4$	4,93	< 1,0	0	2 (< 3)	ausencia	ausencia
	5	$8,0 \times 10^4$	4,90	$1,0 \times 10^1$	1	2 (< 3)	ausencia	ausencia
Prom ± D.est			4,60 ± 0,37		1,39 ± 1,13			
05-02-02	1	$3,1 \times 10^5$	5,49	$1,1 \times 10^4$	4,04	2 (< 3)	presencia	ausencia
	2	$2,8 \times 10^5$	5,45	$1,3 \times 10^4$	4,11	2 (< 3)	presencia	ausencia
	3	$1,0 \times 10^5$	5,00	< 1,0	0	2 (< 3)	ausencia	ausencia
	4	$1,1 \times 10^5$	5,04	< 1,0	0	2 (< 3)	ausencia	ausencia
	5	$1,3 \times 10^4$	4,11	$2,0 \times 10^1$	1,3	2 (< 3)	ausencia	presencia
Prom ± D.est			5,02 ± 0,56		0,89 ± 2,06			
26-02-02	1	$7,1 \times 10^4$	4,85	$5,4 \times 10^2$	2,73	2 (< 3)	ausencia	ausencia
	2	$6,5 \times 10^4$	4,81	$6,0 \times 10^2$	2,77	2 (< 3)	ausencia	ausencia
	3	$6,2 \times 10^4$	4,79	< 1,0	0	2 (< 3)	ausencia	ausencia
	4	$5,8 \times 10^4$	4,76	$1,0 \times 10^1$	1	2 (< 3)	ausencia	ausencia
	5	$2,6 \times 10^4$	4,41	< 1,0	0	2** (< 3)	ausencia	ausencia
Prom ± D.est			4,72 ± 0,18		1,30 ± 1,39			

* Este valor será considerado igual a 1, por conveniencia para el resultado de Log₁₀.

** A los valores del NMP <3 se les asignó el valor numérico 2,0 para incluirlos en el análisis de datos.

2.2 Resultados de análisis estadísticos del recuento de bacterias mesófilas por fecha de elaboración, en muestras de leche pasteurizada a tina llena

- **Chequeo de varianza**

Bartlett's test: 1,71219 P-Value = 0,0443428

El valor P de Bartlett's es 0,0443428, éste valor es menor que 0,05, lo que indica que hay diferencia estadísticamente significativa entre la desviación estándar al 95.0% de nivel de confianza. Invalidando el análisis de varianza.

2.3 Resultados de análisis estadísticos del recuento de enterobacterias por fecha de elaboración, en muestras de leche pasteurizada a tina llena

- **Chequeo de varianza**

Bartlett's test: $2,51442 \times 10^6$ P-Value = 0,0

El valor P de Bartlett es 0,0 éste valor es menor que 0,05, lo que indica que hay diferencia estadísticamente significativa entre la desviación estándar al 95.0% de nivel de confianza. Invalidando el análisis de varianza.

ANEXO 3

Queso salida de prensa

3.1 Análisis microbiológico por fecha de muestreo.

Fecha elaboración	Tina	Enterob ufc/g	Enterob Log ufc/g	<i>E.coli</i>
05-11-01	1	$3,6 \times 10^4$	4,56	presencia
	2	$2,5 \times 10^3$	3,40	presencia
	3	$2,7 \times 10^3$	3,43	presencia
	4	$4,4 \times 10^3$	3,64	presencia
	5	$2,1 \times 10^3$	3,32	presencia
Prom \pm D.est			3,67 \pm 0,,51	
10-01-02	1	$3,6 \times 10^4$	4,56	ausencia
	2	$1,0 \times 10^3$	3,00	ausencia
	3	$4,6 \times 10^2$	2,66	ausencia
	4	$4,0 \times 10^1$	1,60	presencia
	5	$3,0 \times 10^1$	1,48	ausencia
Prom \pm D.est			2,66 \pm 1,25	
21-01-02	1	$9,0 \times 10^2$	2,95	presencia
	2	$1,1 \times 10^3$	3,04	presencia
	3	$3,3 \times 10^3$	3,52	ausencia
	4	$1,9 \times 10^3$	3,28	presencia
	5	$8,1 \times 10^1$	1,91	ausencia
Prom \pm D.est			2,94 \pm 0,62	
05-02-02	1	$1,1 \times 10^4$	4,04	ausencia
	2	$3,7 \times 10^4$	4,57	presencia
	3	$1,2 \times 10^3$	3,08	presencia
	4	$9,9 \times 10^2$	2,99	presencia
	5	$2,4 \times 10^3$	3,38	presencia
Prom \pm D.est			3,61 \pm 0,68	
26-02-02	1	$3,9 \times 10^5$	5,59	presencia
	2	$3,8 \times 10^5$	5,58	presencia
	3	$2,4 \times 10^5$	5,38	presencia
	4	$1,8 \times 10^4$	4,26	ausencia
	5	$1,6 \times 10^4$	4,20	ausencia
Prom \pm D.est			5,00 \pm 0,71	

3.2 Análisis estadísticos por fecha de muestreo, en muestras de queso a la salida de prensa.

- **Chequeo de varianza**

Bartlett's test: 1,23174 P-Value = 0,435227

El valor P de Bartlett's es 0,435227, éste valor es mayor que 0,05, lo que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre la desviación estándar al 95.0% de nivel de confianza.

- **Análisis de varianza (ANDEVA)**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	16,4358	4	4,10895	6,50	0,0016
Within groups	12,6518	20	0,632588		
Total (Corr.)	29.0875	24			

El valor P es menor a 0,05, esto quiere decir que hay diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de cada fecha de muestreo a un nivel de confianza al 95.0%

- **Tests de Rango Múltiple**

Method: 95,0 percent Tukey HSD

Muestreo	Count	Mean	Homogeneous Groups
2	5	2,66	X
3	5	2,94	X
4	5	3,612	XX
1	5	3,67	XX
5	5	5,002	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	1,01	1,5057
1 - 3	0,73	1,5057
1 - 4	0,058	1,5057
1 - 5	-1,332	1,5057
2 - 3	-0,28	1,5057
2 - 4	-0,952	1,5057
2 - 5	*-2,342	1,5057
3 - 4	-0,672	1,5057
3 - 5	*-2,062	1,5057
4 - 5	-1,39	1,5057

* denotes a statistically significant difference.

Esta tabla muestra un test de comparación múltiple entre promedios, para determinar cuales promedios son estadísticamente diferentes. Donde se han identificado 2 grupos homogéneos, usando una columna de X.

ANEXO 4

Queso con cero días de maduración

4.1 Análisis microbiológico por fecha de muestreo

Fecha elaboración	Tina	Enterob ufc/g	Enterob Log ufc/g	N.M.P esporas /g	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>
05-11-01	1	6,0 x 10 ⁴	4,78	2 (< 3)	ausencia	presencia
	2	1,2 x 10 ⁴	4,08	9	ausencia	presencia
	3	2,2 x 10 ⁴	4,34	14	ausencia	presencia
	4	2,0 x 10 ⁴	4,30	2	ausencia	presencia
	5	1,5 x 10 ²	2,18	7	ausencia	presencia
Prom + D.est			3,94 ± 1,01			
10-01-02	1	2,0x 10 ¹	1,30	2 (< 3)	presencia	presencia
	2	7,0x 10 ²	2,85	2 (< 3)	ausencia	ausencia
	3	9,9	0,99	2 (< 3)	ausencia	ausencia
	4	1,0 x 10 ¹	1,00	2 (< 3)	presencia	ausencia
	5	1,5 x 10 ²	2,18	2 (< 3)	ausencia	ausencia
Prom + D.est			1,66 ± 0,82			
21-01-02	1	1,2 x 10 ²	2,08	2 (< 3)	ausencia	presencia
	2	1,5 x 10 ⁴	4,18	2 (< 3)	ausencia	presencia
	3	5,0x 10 ¹	1,70	2 (< 3)	ausencia	ausencia
	4	7,0 x 10 ¹	1,85	2 (< 3)	ausencia	presencia
	5	1,2 x 10 ¹	1,08	2 (< 3)	ausencia	ausencia
Prom + D.est			2,18 ± 1,18			
05-02-02	1	8,1 x 10 ³	3,91	2 (< 3)	ausencia	ausencia
	2	3,9 x 10 ⁴	4,59	2 (< 3)	presencia	ausencia
	3	8,9 x 10 ⁴	4,95	2 (< 3)	ausencia	presencia
	4	1,7 x 10 ⁴	4,23	2 (< 3)	ausencia	presencia
	5	1,1 x 10 ⁴	4,04	2 (< 3)	ausencia	presencia
Prom + D.est			4,34 ± 0,42			
26-02-02	1	2,5 x 10 ⁵	5,40	2 (< 3)	presencia	presencia
	2	1,4 x 10 ⁶	6,15	2 (< 3)	presencia	presencia
	3	1,6 x 10 ⁶	6,20	2 (< 3)	presencia	presencia
	4	2,2 x 10 ⁵	5,34	2 (< 3)	ausencia	ausencia
	5	1,9 x 10 ⁵	5,28	2 (< 3)	ausencia	ausencia
Prom + D.est			5,67 ± 0,46			

4.2 Análisis estadístico por fecha de muestreo, en muestras de queso con 0 días de maduración

- **Chequeo de varianza**

Bartlett's test: 1, 34931 P-Value = 0, 24442

El valor P de Bartlett's es 0,24442, éste valor es mayor que 0,05, lo que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre la desviación estándar al 95,0% de nivel de confianza.

- **Análisis de varianza (ANDEVA)**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	53,6488	4	13,4122	19,24	0,0000
Within groups	13,9388	20	0,696938		
Total (Corr.)	67,5876	24			

El valor P es menor a 0,05, esto quiere decir que hay diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de cada muestreo a un nivel de confianza al 95,0%

- **Tests de Rango Múltiple**

 Method: 95,0 percent Tukey HSD

Muestreo	Count	Mean	Homogeneous Groups
2	5	1,664	X
3	5	2,178	X
1	5	3,936	X
4	5	4,344	X
5	5	5,674	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*2,272	1,58043
1 - 3	*1,758	1,58043
1 - 4	-0,408	1,58043
1 - 5	*-1,738	1,58043
2 - 3	-0,514	1,58043
2 - 4	*-2,68	1,58043
2 - 5	*-4,01	1,58043
3 - 4	*-2,166	1,58043
3 - 5	*-3,496	1,58043
4 - 5	-1,33	1,58043

 * denotes a statistically significant difference.

En esta tabla se muestra un test de comparación múltiple entre promedios, para determinar cuales promedios son estadísticamente diferentes. Donde se han identificado 3 grupos homogéneos, usando una columna de X.

ANEXO 5

Queso con 28 días de maduración

5.1 Análisis microbiológico por fecha de muestreo

Fecha elaboración	Tina	Enterob ufc/g	Enterob Log ufc/g	N.M.P esporas / g	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>
05-11-01	1	$2,4 \times 10^4$	4,38	7	ausencia	presencia
	2	$6,2 \times 10^2$	2,80	7	ausencia	ausencia
	3	$3,1 \times 10^3$	3,49	23	ausencia	presencia
	4	$1,1 \times 10^3$	3,04	15	presencia	ausencia
	5	$1,2 \times 10^4$	4,08	9	ausencia	presencia
Prom + D.est			3,56 ± 0,67			
10-01-02	1	$1,0 \times 10^1$	1,0	2 (< 3)	ausencia	ausencia
	2	$1,4 \times 10^2$	2,15	2 (< 3)	ausencia	ausencia
	3	9,9	0,99	2 (< 3)	ausencia	ausencia
	4	9,9	0,99	2 (< 3)	ausencia	ausencia
	5	$5,0 \times 10^1$	1,7	2 (< 3)	ausencia	ausencia
Prom + D.est			1,37 ± 0,53			
21-01-02	1	$9,0 \times 10^1$	1,95	2 (< 3)	ausencia	ausencia
	2	$6,7 \times 10^3$	3,38	2 (< 3)	ausencia	presencia
	3	$3,0 \times 10^1$	1,48	2 (< 3)	ausencia	ausencia
	4	$4,0 \times 10^1$	1,6	2 (< 3)	ausencia	presencia
	5	$1,0 \times 10^1$	1,0	2 (< 3)	ausencia	ausencia
Prom + D.est			1,97 ± 1,09			
05-02-02	1	$1,5 \times 10^3$	3,18	2 (< 3)	presencia	ausencia
	2	$1,7 \times 10^3$	3,23	2 (< 3)	presencia	ausencia
	3	$4,6 \times 10^3$	3,66	2 (< 3)	ausencia	presencia
	4	$4,7 \times 10^3$	3,67	2 (< 3)	ausencia	presencia
	5	$2,4 \times 10^3$	3,38	2 (< 3)	ausencia	presencia
Prom + D.est			3,42 ± 0,23			
26-02-02	1	$2,1 \times 10^3$	3,32	2 (< 3)	presencia	presencia
	2	$2,4 \times 10^4$	4,38	2 (< 3)	presencia	presencia
	3	$2,1 \times 10^4$	4,32	2 (< 3)	presencia	presencia
	4	$1,8 \times 10^3$	3,26	2 (< 3)	ausencia	ausencia
	5	$1,2 \times 10^3$	3,08	2 (< 3)	ausencia	ausencia
Prom + D.est			3,67 ± 0,63			

5.2 Análisis estadísticos por fecha de muestreo, en muestras de queso con 28 días de maduración

- **Chequeo de varianza**

Bartlett's test: 1,49551 P-Value = 0,120028

El valor P de Bartlett's es 0,120028, éste valor es mayor que 0,05, lo que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre la desviación estándar al 95% de nivel de confianza.

- **Análisis de varianza (ANDEVA)**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	22,3313	4	5,58281	11,76	0,0000
Within groups	9,49708	20	0,474854		
Total (Corr.)	31,8283	24			

El valor P es menor a 0,05, esto quiere decir que hay diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de cada muestreo a un nivel de confianza al 95,0%

- **Test de Rango Múltiple**

Method: 95,0 percent Tukey HSD

Muestreo	Count	Mean	Homogeneous Groups
2	5	1,366	X
3	5	1,972	X
4	5	3,424	X
1	5	3,558	X
5	5	3,672	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*2,192	1,30454
1 - 3	*1,586	1,30454
1 - 4	0,134	1,30454
1 - 5	-0,114	1,30454
2 - 3	-0,606	1,30454
2 - 4	*-2,058	1,30454
2 - 5	*-2,306	1,30454
3 - 4	*-1,452	1,30454
3 - 5	*-1,7	1,30454
4 - 5	-0,248	1,30454

* denotes a statistically significant difference.

En esta tabla se muestra un test de comparación múltiple entre promedios, para determinar cuales promedios son estadísticamente diferentes. Donde se han identificado 2 grupos homogéneos, usando una columna de X.

ANEXO 6

Análisis estadísticos de recuentos de enterobacterias en queso a la salida prensa, día cero y 28 días de maduración, para una misma fecha de elaboración.

6.1 Quesos de la primera fecha de elaboración.

- **Análisis de varianza (ANDEVA)**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,376973	2	0,188487	0,33	0,7285
Within groups	6,954	12	0,5795		
Total (Corr.)	7,33097	14			

El valor P es mayor a 0,05, es decir, que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los quesos provenientes de las etapas de prensado, después del oreado y producto madurado a un nivel de confianza del 95%.

6.2 Quesos de la segunda fecha de elaboración.

- **Análisis de varianza (ANDEVA)**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	4,59209	2	2,29605	2,73	0,1052
Within groups	10,085	12	0,84042		
Total (Corr.)	14,6771	14			

El valor P es mayor a 0,05, es decir, no hay diferencia estadísticamente significativa entre los quesos provenientes de las etapas de prensado, después del oreado y producto madurado a un nivel de confianza del 95%.

6.3 Quesos de la tercera fecha de elaboración.

- **Análisis de varianza (ANDEVA)**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2,97937	2	1,48969	1,73	0,2192
Within groups	10,35	12	0,862497		
Total (Corr.)	13,3293	14			

El valor P es mayor a 0,05, es decir, no hay diferencia estadísticamente significativa entre los quesos provenientes de las etapas de prensado, después del oreado y producto madurado a un nivel de confianza del 95%.

6.4 Quesos de la cuarta fecha de elaboración.

- **Análisis de varianza (ANDEVA)**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2,36261	2	1,18131	5,13	0,0245
Within groups	2,76152	12	0,230127		
Total (Corr.)	5.12413	14			

El valor P es menor que 0,05, es decir, hay diferencia estadísticamente significativa entre los quesos provenientes de las etapas de prensado, después del oreado y producto madurado a un nivel de confianza del 95%.

- **Test de Rango Múltiple**

Method: 95,0 percent Tukey HSD

Etapas	Count	Mean	Homogeneous Groups
Queso con 28 días maduración = 3	5	3,424	X
Queso salida de prensa = 1	5	3,612	XX
Queso día cero = 2	5	4,344	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	-0,732	0,811651
1 - 3	0,188	0,811651
2 - 3	*0,92	0,811651

* denotes a statistically significant difference.

Esta tabla muestra un test de comparación múltiple entre quesos en sus diferentes etapas, provenientes de la cuarta fecha de elaboración, y determina que etapa es estadísticamente diferente. Donde se han identificado 2 grupos homogéneos identificados por una columna de X.

6.5 Quesos de la quinta fecha de elaboración.

- **Análisis de varianza (ANDEVA)**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	10,3808	2	5,19041	14,07	0,0007
Within groups	4,42688	12	0,368907		
Total (Corr.)	14,8077	14			

El valor P es menor que 0,05, es decir, hay diferencia estadísticamente significativa entre los quesos provenientes de las etapas de prensado, después del oreado y producto madurado a un nivel de confianza del 95%.

- **Test de Rango Múltiple**

Method: 95,0 percent Tukey HSD

Etapas	Count	Mean	Homogeneous Groups
Queso con 28 días maduración = 3	5	3,672	X
Queso salida de prensa = 1	5	5,002	X
Queso día cero = 2	5	5,674	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	-0,672	1,02765
1 - 3	*1,33	1,02765
2 - 3	*2,002	1,02765

* denotes a statistically significant difference.

Esta tabla muestra un test de comparación múltiple entre quesos en sus diferentes etapas, provenientes de la quinta fecha de elaboración, y determina que etapa es estadísticamente diferente. Donde se han identificado 2 grupos homogéneos identificados por una columna de X.

ANEXO 7

Resultados del control microbiológico en las manos de los manipuladores

Fecha de elaboración	Manipulador	<i>S. aureus</i>	Enterobacterias	<i>E. coli</i>
05 – 11 - 01	1	Presencia	Presencia	Ausencia
	2	Presencia	Presencia	Ausencia
10 – 01 - 02	3	Presencia	Presencia	Ausencia
	4	Ausencia	Ausencia	Ausencia
21 – 01 - 02	5	Presencia	Ausencia	Ausencia
	6	Presencia	Ausencia	Ausencia
05 – 02 - 02	7	Presencia	Presencia	Ausencia
	8	Presencia	Presencia	Ausencia
26 – 02 - 02	9	Presencia	Presencia	Presencia
	10	Presencia	Presencia	Presencia

ANEXO 8

Resultados de control microbiológico en moldes

Fecha de elaboración	Molde	Bacterias mesófilas ufc / 25 cm ²	Bacterias mesófilas ufc / cm ² **	Enterobacterias ufc / 25 cm ²	Enterobacterias ufc / cm ² **	<i>E. coli</i>
05 - 11 - 01	1	30	1,2	0,99	0,04	Ausencia
	2	0,99 *	0,04	0,99	0,04	Ausencia
	3	27	1,1	0,99	0,04	Ausencia
Promedio		22	0,78	0,99	0,04	
10 - 01 - 02	1	7	0,28	0,99	0,04	Ausencia
	2	4	0,16	0,99	0,04	Ausencia
	3	3	0,12	0,99	0,04	Ausencia
Promedio		4,67	0,19	0,99	0,04	
21 - 01 - 02	1	15	0,6	0,99	0,04	Ausencia
	2	16	0,64	2	0,08	Presencia
	3	195	7,8	1	0,04	Ausencia
Promedio		75,3	3,01	4,0	0,05	
05 - 02 - 02	1	65	2,6	55	2,2	Presencia
	2	55	2,2	44	1,8	Ausencia
	3	41	1,64	39	1,6	Ausencia
Promedio		53,67	2,15	46	1,9	
26 - 02 - 02	1	0,99	0,04	0,99	0,04	Ausencia
	2	0,99	0,04	0,99	0,04	Ausencia
	3	0,99	0,04	0,99	0,04	Ausencia
Promedio		0,99	0,04	0,99	0,04	

* < 1,0 ufc / 25 cm²

** Los resultados fueron llevados a cm² para una mayor facilidad de realizar una comparación de éstos.

ANEXO 9

Tina de pre prensado

9.1 Control microbiológico por fecha de muestreo

		Fondo de la tina					Costados de la tina (Rodac)	
Fecha de elaboración	Muestras	Bacterias mesófilas ufc / 25 cm ²	Bacterias mesófilas ufc / cm ² *	Enterob ufc/25 cm ²	Enterob ufc / cm ² *	<i>E. coli</i>	Bact. Mesóf. ufc / 28 cm ²	Bact. Mesóf. ufc/cm ² *
05 – 11 - 01	1	17	0,68	0,9	0,04	Ausencia	52	1,9
	2	11	0,44	0,9	0,04	Ausencia	45	1,6
Promedio		14	0,6	0,9	0,04		49	1,8
10 – 01 – 02	1	18	0,72	24	0,96	Ausencia	3	0,1
	2	22	0,88	0,9	0,04	Ausencia	7	0,25
Promedio		20	0,8	12,45	0,5		5	0,18
21 – 01 – 02	1	18	0,72	0,9	0,04	Ausencia	48	1,7
	2	0,9	0,04	0,9	0,04	Ausencia	66	2,4
Promedio		9,45	0,38	0,9	0,04		57	2,04
05 – 02 – 02	1	75	3	16	0,64	Ausencia	62	2,2
	2	28	1,12	60	2,4	Ausencia	38	1,36
Promedio		51,2	2,05	38	1,52		50	1,8
26 – 02 – 02	1	6	0,24	0,9	0,04	Ausencia	40	1,4
	2	3	0,12	0,9	0,04	Ausencia	15	0,54
Promedio		4,5	0,18	0,9	0,04		28	1

* Los resultados fueron llevados a cm² para una mayor facilidad de realizar una comparación de estos.

9.2 Análisis estadísticos por fecha de elaboración en superficies del fondo de la tina para el recuento de bacterias mesófilas

- **Chequeo de varianza**

Bartlett's test: 6,38482 P-Value = 0,157315

El valor P de Bartlett's es 0,157315, éste valor es menor que 0,05, lo que indica que hay diferencia estadísticamente significativa entre la desviación estándar al 95.0% de nivel de confianza. Invalidando el análisis de varianza.

9.3 Resultados de análisis estadísticos por fecha de elaboración en superficies del fondo de la tina para el recuento de enterobacterias

- **Chequeo de varianza**

Bartlett's test: 1,21789 P-Value = 0,608188

El valor P de Bartlett's es 0,608188, éste valor es mayor que 0,05, lo que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre la desviación estándar al 95% de nivel de confianza.

- **Análisis de varianza (ANDEVA)**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	3,29856	4	0,82464	2,09	0,2196
Within groups	1,972	5	0,3944		
Total (Corr.)	5,27056	9			

El valor P es mayor a 0,05, es decir, que no existe diferencia estadísticamente significativa a un nivel de confianza del 95 % en los recuentos de enterobacterias de las superficies de la tina, entre las fechas de elaboración.

9.4 Análisis estadísticos por fecha de elaboración en superficies de los costados de la tina para el recuento de bacterias mesófilas

- **Chequeo de varianza**

Bartlett's test: 1,85978 P-Value = 0,696116

El valor P de Bartlett es 0,696116, éste valor es mayor que 0,05, lo que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre la desviación estándar al 95% de nivel de confianza.

- **Análisis de varianza (ANDEVA)**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	4,7196	4	1,1799	5,76	0,0410
Within groups	1,02385	5	0,20477		
Total (Corr.)	5,74345	9			

El valor P es menor a 0,05, es decir, que existe diferencia estadísticamente significativa a un nivel de confianza del 95 % en los recuentos de bacterias mesófilas en las superficie de los costados de la tina, entre las fechas de elaboración.

- **Test de Rango Múltiple**

Method: 95,0 percent Tukey HSD

Fechas	Count	Mean	Homogeneous Groups
2	2	0,175	X
5	2	0,97	XX
1	2	1,75	XX
4	2	1,78	XX
3	2	2,05	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	1,575	1,80696
1 - 3	-0,3	1,80696
1 - 4	-0,03	1,80696
1 - 5	0,78	1,80696
2 - 3	*-1,875	1,80696
2 - 4	-1,605	1,80696
2 - 5	-0,795	1,80696
3 - 4	0,27	1,80696
3 - 5	1,08	1,80696
4 - 5	0,81	1,80696

* denotes a statistically significant difference.

Esta tabla muestra un test de comparación múltiple entre los recuentos de bacterias mesófilas provenientes de diferentes fechas de elaboración para determinar que fechas son estadísticamente diferentes. Donde se han identificado 2 grupos homogéneos identificados por una columna de X.

ANEXO 10

Control microbiológico de ambiente (ufc/15 minutos de exposición)

Fecha de elaboración	Análisis	Área tina coagulación	Área tina pre prensado	Sector moldes	Sector prensado
05 - 11 - 01	Bacterias mesófilas	76	95	107	54
	Mohos	7	6	18	21
	Levaduras	32	32	44	28
10 - 01 - 02	Bacterias mesófilas	94	88	102	32
	Mohos	8	28	20	8
	Levaduras	18	21	12	21
21 - 01 - 02	Bacterias mesófilas	92	67	70	39
	Mohos	11	8	6	8
	Levaduras	4	10	0	4
05 - 02 - 02	Bacterias mesófilas	17	86	*	*
	Mohos	6	10	*	*
	Levaduras	1	0	*	*
26 - 02 - 02	Bacterias mesófilas	35	60	*	122
	Mohos	10	6	*	13
	Levaduras	4	4	*	30

* En éstas fechas, se tomaron muestras en otros sectores que se indican a continuación:

Fecha de elaboración	Análisis	Sector pasillo	Sector oreado	Fecha de elaboración	Análisis	Sector fermentación
05 - 02 - 02	Bacterias mesófilas	16	83	26 - 02 - 02	Bacterias mesófilas	150
	Mohos	3	70		Mohos	7
	Levaduras	0	11		Levaduras	4

ANEXO 11

Resultados de la determinación de pH en leche y queso

Fecha de elaboración	Tina	pH leche pasteurizada a tina llena	pH queso salida de prensa	pH queso día cero	pH queso 28 días de maduración
05 – 11 - 01	1	6,75	5,47	5,50	5,41
	2	6,80	5,26	5,50	5,40
	3	6,80	5,47	5,40	5,39
	4	6,80	5,45	5,50	5,40
	5	6,80	5,27	5,40	5,43
Promedio		6,79	5,38	5,46	5,41
10 – 01 - 02	1	6,73	5,95	5,30	5,35
	2	6,73	5,25	5,30	5,40
	3	6,66	5,49	5,35	5,50
	4	6,62	5,38	5,20	5,33
	5	6,67	5,47	5,30	5,50
Promedio		6,68	5,51	5,29	5,42
21 – 01 - 02	1	6,68	5,89	5,20	5,35
	2	6,66	5,92	5,20	5,35
	3	6,71	5,78	5,20	5,30
	4	6,61	5,79	5,25	5,25
	5	6,64	5,85	5,25	5,30
Promedio		6,66	5,85	5,22	5,31
05 – 02 - 02	1	6,65	5,30	5,30	5,35
	2	6,64	5,35	5,40	5,40
	3	6,69	5,42	5,25	5,30
	4	6,71	5,22	5,30	5,30
	5	6,71	5,24	5,30	5,35
Promedio		6,68	5,31	5,31	5,34
26 – 02 - 02	1	6,66	5,44	5,35	5,60
	2	6,66	5,37	5,40	5,63
	3	6,67	5,44	5,25	5,45
	4	6,69	5,43	5,30	5,50
	5	6,67	5,43	5,30	5,53
Promedio		6,67	5,42	5,32	5,54

ANEXO 12

Temperaturas y humedad por fecha de muestreo determinadas en diferentes secciones de la planta

Fecha de muestreo	Sección	Temperatura (°C)	% HR
05- 11- 01	Sala de proceso	26,4	68
21 – 01 - 02	Sala de proceso	25,0	99
	Pre maduración	13	71
	Sala maduración 1	9,0	63
	Sala maduración 2	9,0	63
	Sala maduración 3	7,5	62
21- 01 - 02	Sala de proceso	27,0	70
05 – 02 - 02	Sala de proceso	28,0	71
	Pre maduración	9,0	76
	Sala maduración	5,0	81
	Sala de proceso	28,0	57
26 – 02 - 02	Sala de proceso	25,0	89
	Pre maduración	8,5	85
	Sala maduración	8,5	57
	Sala maduración	4,5	64