



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias Agrarias

**Escuela de Ingeniería en Alimentos**

# **Identificación de Bacterias Responsables de Fenómenos Gaseosos Indeseables en Queso Gauda**

Tesis presentada como parte de los  
requisitos para optar al grado de  
Licenciado en Ciencia de los Alimentos

**Paula Verónica Contreras Alvarado**

Valdivia - Chile  
2008

**PROFESOR PATROCINANTE:**

---

Sr. Haroldo Magariños Hawkins  
Técnico en Lechería, M. en Ciencia y Tecnología de  
la leche  
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**PROFESORES INFORMANTES:**

---

Sra. Marcia Costa Lobo  
Ingeniero Civil Bioquímico  
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

---

Sr. Héctor Cuitiño Díaz  
Ingeniero en Ejecución en Alimentos  
Prolesur S.A.

## **AGRADECIMIENTOS**

- A mis Padres, Epimenio y Adela por su amor, esfuerzo y dedicación incondicional.
- A mis hermanos, Mauricio y Alejandro, a Rosy y Cristian por su constante apoyo.
- A mis amigas Valeria, Andrea, Pamela y Blanca, por su amistad y apoyo durante estos años de Universidad.
- A mi profesor patrocinante Sr. Haroldo Magariños y a la profesora Sra. Marcia Costa, por su constante colaboración, consejos y comprensión entregada durante esta investigación.
- A las profesoras Sra. Sade Selaive y Sra. Mariella Horzella, por su colaboración y disponibilidad de tiempo prestados.
- A la empresa PROLESUR, por el financiamiento de este estudio. En especial al personal del Laboratorio de Microbiología y a Don Hector Cuitiño por su constante cooperación y apoyo.

**INDICE DE MATERIAS**

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	El Queso	3
2.1.1	Clasificación de los quesos	4
2.1.2	Características del queso tipo Gauda	5
2.2	La calidad de la leche como materia prima	6
2.3	Defectos de origen microbiano en los quesos	8
2.4	Microorganismos productores de gas	8
2.5	Origen de los ojos en el queso	10
2.6	Características de las bacterias propiónicas	12
2.7	Fermentación propiónica	14
3	MATERIAL Y MÉTODO	17
3.1	Lugar de ensayo	17
3.2	Materiales	17
3.2.1	Materias primas	18
3.2.2	Reactivos	18
3.3	Metodología	18
3.3.1	Método de muestreo	18
3.3.1.1	Muestras líquidas	20
3.3.1.2	Muestras sólidas	20
3.3.1.3	Dilución de las muestras	20
3.3.2	Métodos de análisis	21

3.3.2.1	Técnica de Weinzirl	21
3.3.2.2	Recuento de bacterias propiónicas	21
3.3.2.3	Prueba de la catalasa	22
3.3.2.4	Tinción de Gram	22
3.4	Análisis de resultados	23
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	24
4.1	Identificación de bacterias propiónicas	24
4.2	Recuento de bacterias propiónicas dentro de la línea de elaboración del queso tipo Gauda	27
4.2.1	Recuento de bacterias propiónicas en la etapa preliminar de muestreo	27
4.2.2	Recuento de bacterias propiónicas en la segunda etapa de muestreo	28
4.2.2.1	Recuento de bacterias propiónicas utilizando leche proveniente de Los Lagos	29
4.2.2.2	Recuento de bacterias propiónicas utilizando leche proveniente de Temuco	32
4.2.2.3	Recuento de bacterias propiónicas utilizando leche proveniente de Osorno	35
4.2.2.4	Recuento de bacterias propiónicas en concentrado proteico de leche	37
5	CONCLUSIONES	43
6	RESUMEN - SUMMARY	44
7	BIBLIOGRAFÍA	46
8	ANEXOS	51

**INDICE DE CUADROS**

<b>Cuadros</b>		<b>Página</b>
1	Clasificación de quesos de acuerdo al contenido de materia grasa	4
2	Clasificación de quesos de acuerdo al contenido de humedad	5
3	Requisitos físicos y químicos del queso Gauda	6
4	Principales grupos microbianos responsables de producción de gas en el queso	9
5	Puntos y número de muestras en la línea de elaboración del queso tipo Gauda	19
6	Formulación medio de cultivo YELA	22
7	Resultados prueba de la catalasa para cada tipo de colonia	25

**INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Fermentación propiónica	16
2	Colonias de bacterias propiónicas identificadas	24
3	<i>Propionibacterium</i> sp. tinción de Gram mostrando las disposiciones típicas de las células	26
4	Recuento de bacterias propiónicas en la etapa preliminar de muestreo	27
5	Comparación del recuento de bacterias propiónicas en leche cruda y pasteurizada de Los Lagos	29
6	Comparación de recuento de bacterias propiónicas en queso a la salida de prensa, salida de saladero y con 30 días de maduración, elaborado con leche proveniente de Los Lagos	30
7	Tendencia del recuento de bacterias propiónicas durante los muestreos realizados con leche proveniente de Los Lagos	31
8	Comparación del recuento de bacterias propiónicas en leche cruda y pasteurizada de Temuco	32
9	Comparación de recuento de bacterias propiónicas en quesos a la salida de prensa, salida de saladero y con 30 días de maduración, elaborado con leche proveniente de Temuco	33
10	Tendencia del recuento de bacterias propiónicas durante los muestreos realizados con leche proveniente de Temuco	34
11	Comparación del recuento de bacterias propiónicas en leche cruda y pasteurizada de Osorno	35

12	Comparación de recuento de bacterias propiónicas en quesos a la salida de prensa, salida de saladero y con 30 días de maduración, elaborado con leche proveniente de Osorno	36
13	Tendencia del recuento de bacterias propiónicas durante los muestreos realizados con leche proveniente de Osorno	37
14	Comparación de recuentos de bacterias propiónicas en concentrado proteico de leche en distintas fechas de muestreo	38
15	Comparación del promedio de recuento de bacterias propiónicas en los puntos de muestreo, con leche de Los Lagos, Temuco y Osorno	39

**INDICE DE ANEXOS**

<b>Anexo</b>	<b>Página</b>	
1	Diagrama de flujo queso tipo gauda	51
2	Diluciones usadas para cada tipo de muestra	53
3	Resultados primera etapa de muestreo	54
3.1	Recuentos de bacterias propiónicas en la materia prima	54
3.1.1	Análisis estadístico del recuento de bacterias propiónicas en la materia prima	54
3.2	Recuentos de bacterias propiónicas en la secuencia de Muestreo	55
3.2.1	Análisis estadístico del recuento de bacterias propiónicas en la secuencia de muestreo	55
4	Leche entera de Los Lagos	57
4.1	Resultados recuentos de bacterias propiónicas en muestreos con entera de Los Lagos	57
4.2	Análisis estadístico de los resultados con leche entera de Los Lagos	58
5	Leche entera de Temuco	60
5.1	Resultados recuentos de bacterias propiónicas en muestreos con leche entera de Temuco	60

5.2	Análisis estadístico de los resultados con leche entera de Temuco	61
6	Leche entera de Osorno	63
6.1	Resultados recuentos de bacterias propiónicas en muestreos con leche entera de Osorno	63
6.2	Análisis estadístico de los resultados con leche entera de Osorno	64
7	Resultados recuentos de bacterias propiónicas en concentrado Proteico de leche	66
8	Comparación entre diferentes leche utilizadas	67
8.1	Comparación del recuento de bacterias propiónicas en leche cruda y pasteurizada de Temuco	67
8.2	Análisis estadísticos de los promedios de las distintas leches	67
9	Quesos con 30 días de maduración	68
9.1	Imágenes de quesos con 30 días de maduración, elaborados con leche proveniente de Los Lagos	68
9.2	Imágenes de quesos con 30 días de maduración, elaborados con leche proveniente de Temuco	69
9.3	Imágenes de quesos con 30 días de maduración, elaborados con leche proveniente de Osorno	70

## I. INTRODUCCIÓN

Las fermentaciones gaseosas anormales representan en quesería el tipo de alteración microbiana más importante debido a:

- La imposibilidad de su corrección
- Su alta frecuencia de aparición (debido a la gran variedad de grupos microbianos implicados)
- Gran impacto económico al afectar grandes volúmenes de producción.

En el último tiempo varias producciones de queso tipo Gauda elaborado en la empresa Prolesur se han visto afectadas por alteraciones gasógenas que no responden a las características de las bacterias alterantes tradicionales (coliformes, levaduras, clostridios), las cuales además se encuentran en constante análisis y bajo control.

El defecto que se está presentando en el queso tipo Gauda corresponde a una apertura anormal de la masa, presentando ojos de tipo granular, de tamaño y formas irregulares (0,1- 0,7 cm de diámetro aproximadamente), los cuales se presentan entre los 15 a 30 días de maduración. Si bien es evidente la apertura de la masa, el sabor en general es agradable, no obstante es un defecto que deprecia su valor y aptitud a la comercialización.

Considerando los antecedentes mencionados se plantea la siguiente hipótesis:

“Las bacterias que estarían provocando el defecto en los quesos tipo Gauda podrían pertenecer a la familia de las *Propionibacterium*”

**Objetivo General:**

- Determinar si existe presencia de bacterias propiónicas en el queso tipo Gauda

**Objetivos específicos:**

- Implementar una metodología analítica para determinar el recuento de bacterias propiónicas
- Evaluar la carga de bacterias propiónicas presentes en la materia prima
- Identificar el o los puntos de mayor recuento de bacterias propiónicas dentro de la línea de elaboración del queso tipo Gauda

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 El queso

Según el Reglamento Sanitario de los Alimentos el queso es el producto madurado o sin madurar, sólido o semisólido, obtenido coagulando leche, leche descremada, leche parcialmente descremada, crema, crema de suero, suero de queso o suero de mantequilla debidamente pasteurizado o una combinación de estas materias, por la acción de cuajos u otros coagulantes apropiados (enzimas específicas o ácidos orgánicos permitidos), y separando parcialmente el suero que se produce como consecuencia de tal coagulación (CHILE. MINISTERIO DE SALUD, 2000).

Los quesos son una forma de conservación de los dos componentes insolubles de la leche: la caseína y la materia grasa; se obtienen por coagulación de la leche seguida del desuerado, en el curso del cual el lactosuero se separa de la cuajada. El lactosuero contiene la mayor parte del agua y de los componentes solubles de la leche, quedando una pequeña parte aprisionada en la cuajada (ALAIS, 1985).

Las etapas básicas en la fabricación tradicional del queso según AMIOT (1991), son:

- Coagulación de la leche: se produce por la desestabilización de la solución coloidal de caseína que origina la aglomeración de las micelas libres y la formación de un gel en el que quedan atrapados el resto de los componentes de la leche.
- Desuerado o sinéresis: se elimina, al mismo tiempo que el agua, una parte de las sustancias que se encuentran en suspensión, es decir, de los elementos del lactosuero. La materia grasa permanece en su mayor parte adherida y retenida en la cuajada de caseína.
- Maduración: se producen diversas modificaciones, por acción de los microorganismos y las enzimas, que dan lugar a las distintas variedades de queso.

**2.1.1 Clasificación de los quesos.** Existen variadas formas de clasificación para los quesos, según los distintos autores, así MADRID (1990), indica que se pueden seguir varios criterios como:

- Según la leche con la que hayan sido elaborados
- Según el método de coagulación de la leche que se haya empleado
- Según el contenido de humedad del queso
- Según el contenido en grasa del queso
- Según la textura del queso acabado
- Según el método seguido en su maduración
- Según el tipo de microorganismos empleados en su elaboración
- Según el país o región de origen

La Norma Chilena Oficial NCh 2065 (1999), indica que se pueden clasificar los quesos de acuerdo al contenido de materia grasa del extracto seco y al contenido de humedad, como sigue:

**CUADRO 1 Clasificación de quesos de acuerdo al contenido de materia grasa**

<b>Denominación</b>	<b>Contenido de materia grasa (% m/m)</b>
Extra grasa o doble crema	no menos del 60 %
Grasos	entre 45,0 y 59,9 %
Semigrasos	entre 25,0 y 44,9 %
Magros	entre 10,0 y 24,9 %
Descremados	menos del 10 %

FUENTE: INN (1999)

**CUADRO 2 Clasificación de quesos de acuerdo al contenido de humedad**

Denominación	Sigla	Contenido de humedad (%m/m)
De baja humedad (pasta dura)	b.h	hasta 35,9 %
De mediana humedad (pasta semidura)	m.h	entre 36,0 y 45,9 %
De alta humedad (pasta blanda)	a.h	entre 46,0 y 54,9 %
De muy alta humedad (pasta muy blanda)	m.a.h	no menor a 55,0 %

FUENTE: INN (1999)

Asimismo Mahecha (1987), citado por FUENTES (2003), sostiene que 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.

**2.1.2 Características del queso tipo Gauda.** El queso Gauda es de tipo semiduro, de aspecto seco o revestido de cera, color amarillento y la masa interna amarillo pálido, consistencia firme y elástica, adecuada para cortar, rebanar o laminar. Presenta una masa cerrada o con escasos ojos redondos (de 2 a 10 mm de diámetro), distribuidos regular o irregularmente en todo el interior del queso, variables que pueden ir desde el tamaño de la cabeza de un alfiler al de un guisante. Se puede presentar en bloques rectangulares desde 2 a 15 kg. Su maduración se produce en un envase de material retráctil durante un mínimo de 15 días en condiciones controladas (CODEX ALIMENTARIUS, 2000; NCh 2478, 1999; MADRID, 1990).

En el CUADRO 3 se presenta la composición físico química del queso Gauda, de acuerdo a la Norma Chilena Oficial NCh 2478, (1999).

**CUADRO 3 Requisitos físicos y químicos del queso Gauda.**

Requisitos	Queso Gauda
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: INN (1999)

En la elaboración del queso tipo Gouda, se utilizan cultivos mesófilos mixtos 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 CO<sub>2</sub>, 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 CO<sub>2</sub>, acetoína y diacetilo. *L. cremoris* fermenta los citratos en presencia de otra fuente hidrocarbonada, (por ejemplo, lactosa), produciendo CO<sub>2</sub>, piruvatos y acetatos (FAO 1983, citado por FUENTES, 2003).

## 2.2 La calidad de la leche como materia prima.

Según MADRID (1990), las cualidades que debe tener una leche para su utilización en quesería son las siguientes:

- Debe coagular bien con el cuajo
- Debe soltar bien el suero
- Buen rendimiento quesero (contenido en caseína)

- Buena calidad microbiológica para obtener quesos de sabor y aroma característicos, sin desarrollos microbianos incontrolados que producen fermentaciones que desvirtúan esas características

Sin embargo, los tratamientos a los cuales es sometida la leche antes de su utilización en quesería muchas veces pueden ser dañinos o convenientes. En cuanto a esto el mismo autor sostiene que los tratamientos que empeoran las actitudes queseras de la leche son: el almacenamiento prolongado a bajas temperaturas ( $2/10^{\circ}\text{C}$ ), tratamientos mecánicos (bombeos, transporte por tuberías, etc.), tratamientos térmicos fuertes ( $> 82/85^{\circ}\text{C}$ ); por el contrario, los que mejoran las actitudes son: maduración de la leche con la adición de cultivos lácticos seleccionados, adición de cloruro cálcico en pequeñas cantidades, lo que favorece el proceso de coagulación y bacteriostasia de la leche para eliminar esporas formadoras de ácido butírico y gases que perjudican la calidad de los quesos acabados.

Según HEIMLICH y CARRILLO (1995), la calidad microbiológica de la leche, expresada como la cantidad de bacterias por ml de leche es el parámetro de calidad más importante a considerar, sin embargo, el recuento de células somáticas también es tomado por las industrias lecheras como un indicador de calidad higiénica que refleja el estado de salud de la ubre del animal.

En cuanto a esto, Butendieck (1997), citado por CARREÑO (2004), sostiene que una leche de buena calidad debería contener menos de  $10^5$  ufc/ml y es la que debería usarse en la elaboración de leche fluida y otros productos frescos.

Sin embargo, ALAIS (1985), señala que la leche es un producto que se altera muy fácilmente, ya que posee una débil y efímera protección natural. El calor la modifica presentando proliferación de numerosos microorganismos, por lo tanto, para el consumo humano y transformaciones industriales exige medidas de defensa contra la invasión de los microorganismos y contra la actividad de las enzimas.

La leche obtenida de la vaca sin asepsia contiene bacterias procedentes del interior de la mama. El estiércol es una posible fuente de contaminación por bacterias coliformes,

lácticas (*Streptococcus faecium*, *Streptococcus faecalis* y otros enterococos, *S. Bovis*, *S. thermophilus* y *Lactobacillus*), bacterias propiónicas, bacilos, clostridios, bacterias productoras de álcali, bacterias inertes, *Micrococcus* y *Arthrobacter*<sup>1</sup>.

Los principales parámetros que debería cumplir la leche cruda de buena calidad según HEESCHEN (1998), son: recuentos bajos de microorganismos saprofitos, ausencia o recuentos muy bajos de microorganismos patógenos, ausencia de residuos debido a las medidas profilácticas y de control de la mastitis, y reducción o minimización de contaminantes, transferidos desde los alimentos.

### 2.3 Defectos de origen microbiano en los quesos

Los microorganismos existentes en la leche utilizada en la elaboración de quesos, pueden provocar fermentaciones anormales, las que producen defectos en el queso que son difíciles de clasificar, debido a sus similitudes, pero con orígenes distintos (MAGARIÑOS, 1980).

Entre las alteraciones de la masa de los quesos se encuentran la hinchazón precoz, la hinchazón butírica, la dureza de la masa, la viscosidad de la masa, la consistencia gomosa o correosa, la consistencia granulosa o arenosa y el achatamiento o aplanado (JIMÉNEZ, 1981).

**2.4 Microorganismos productores de gas.** Los productos de la fermentación de lactato, combinado con el control de los niveles finales de humedad y sal en el queso, una buena higiene y el uso de leche pasteurizada de buena calidad limitan efectivamente el rango de bacterias que pueden producir gas en el queso.

Aunque el gas puede ser producido por un amplio rango de sustratos presentes en el queso, la lactosa, lactato, citrato y urea son los principales sustratos involucrados (MULLAN, 2000). Estos se indican en el CUADRO 4.

---

<sup>1</sup>[http://209.85.165.104/search?q=cache:xF7\\_uKUxv1QJ:www.sagangea.org/hojared\\_biolologica/paginas/contam%2520bacteriana%2520x%2520consumo%2520de%2520animales.htm+origen+bacterias+propi%C3%B3nicas&hl=es&ct=clnk&cd=2&gl=cl](http://209.85.165.104/search?q=cache:xF7_uKUxv1QJ:www.sagangea.org/hojared_biolologica/paginas/contam%2520bacteriana%2520x%2520consumo%2520de%2520animales.htm+origen+bacterias+propi%C3%B3nicas&hl=es&ct=clnk&cd=2&gl=cl)

**CUADRO 4 Principales grupos microbianos responsables de producción de gas en el queso.**

Grupo microbiano	Substrato	Productos gaseosos
Clostridia <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	Lactato	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>
Lactobacillus <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus brevis</i>	Citrato Lactosa	CO <sub>2</sub> CO <sub>2</sub>
Estreptococos <i>Streptococcus thermophilus</i>	Urea	CO <sub>2</sub>
Coliformes Levaduras	Lactosa Lactosa	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> CO <sub>2</sub>
Lactococos <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	Citrato	CO <sub>2</sub>
Bacillus <i>Bacillus subtilis</i>	Lactosa	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>
Leuconostoc <i>Lauconostoc mesenteroides</i> <i>Leuconostoc dextranicum</i>	Lactosa / citrato Lactosa / citrato	CO <sub>2</sub> CO <sub>2</sub>
Propionibacteria <i>Propionibacterium shermani</i>	Lactato	CO <sub>2</sub>

FUENTE: MULLAN (2000).

La producción de gas se acompaña generalmente de la formación de ácido. Excepto en algunos casos concretos, es indeseable en la leche y sus derivados. Los principales organismos productores de gas son los coliformes, *Clostridium* y algunas especies de *Bacillus*, que originan CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> y *Propionibacterium*, heterofermentativos lácticos y levaduras, que producen CO<sub>2</sub> (AMIOT 1991).

Los coliformes pueden originar la hinchazón precoz de los quesos originando una masa coriácea, sabores picantes y amargos y se forman pequeñas aberturas de poco diámetro, de cavidad lisa y brillante, probablemente debido a que su formación tiene lugar cuando la  $a_w$  es alta. Cuando tienen oxígeno, oxidan la lactosa con producción de  $CO_2$ , agua y energía. Si no hay oxígeno, escinden anaerobicamente los compuestos orgánicos y forman subproductos como el ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, etanol, anhídrido carbónico e hidrógeno. Son de origen intestinal, viven y se desarrollan en la leche, el agua de la industria, las manos del personal manipulador, etc. Las temperaturas inferiores a  $4,4^{\circ}C$  impiden su crecimiento y desarrollo, especialmente en las cepas gasógenas. Son anaerobios facultativos. Se inactivan a las temperaturas de pasteurización. Las altas concentraciones de sal y las actividades de agua bajas no son bien toleradas por los coliformes gasógenos (JIMÉNEZ, 1981; SUÁREZ et al., 1990).

A su vez, los Clostridios son los responsables de la "hinchazón tardía". El queso se hincha y si se somete a punción, sale hidrógeno. Alrededor de los ojos, que en su mayor parte son de forma ovalada, aparece una tonalidad más clara que la del resto de la masa. Además del anhídrido carbónico, hidrógeno y ácido butírico, esta fermentación da origen a otros productos secundarios como ácidos volátiles y ésteres, entre otros compuestos químicos (SORDO, 1983).

MADRID (1990), señala que las enzimas del *Str. Diacetylactis* descomponen los citratos en diacetilo y anhídrido carbónico,  $CO_2$  y el *Str. Cremoris* también da origen a diacetilo y fuertes cantidades de  $CO_2$  por lo que no suelen emplearse en quesos de textura cerrada.

## 2.5 Origen de los ojos en el queso

El tipo de ojos presentes en la pasta de un queso es una característica indicativa, tanto de la calidad microbiológica de la leche de partida como de la técnica de la elaboración del queso. Los ojos pueden responder a dos orígenes diferentes: actividad bacteriana y tipo de elaboración. En el primer caso el origen es el gas procedente de las fermentaciones de determinados tipos de bacterias, en general este tipo de ojos son redondeados y lisos de diferentes dimensiones (desde el tamaño de la cabeza de un

alfiler, caso de las bacterias coliformes, hasta el de un garbanzo, propio de bacterias termófilas, capaces de desarrollarse a altas temperaturas), además se pueden presentar grietas cavernosas, más o menos grandes producidas por bacterias del género *Clostridium* que desprenden olores y sabores desagradables.

En el segundo caso, ya sea un exceso de calentamiento de los granos de cuajada o un insuficiente prensado de los mismos, no permiten una correcta compactación de la pasta. Por ello, se producen pequeñas cámaras de aire en el interior del queso, son pequeñas aberturas redondeadas, de borde o superficie irregular. Se les denomina ojos mecánicos y no se castiga su presencia, siempre que el tamaño no sea muy grande (inferior a un grano de arroz) y se encuentren en pequeña cantidad. También se pueden producir grietas verticales u horizontales en número escaso, pero son apariencia cavernosa, defecto relacionado en ocasiones con un enfriamiento de la cuajada durante el moldeo y/o con una incorrecta maduración o conservación<sup>2</sup>.

Por otro lado, si la colocación de los granos de la cuajada en los moldes se hace en presencia de suero, se forman “burbujas” que luego se transformaran en ojos redondeados por el CO<sub>2</sub>. Si la colocación de la cuajada en los moldes se hace sin suero, en los intersticios queda aire y al desarrollarse la producción de CO<sub>2</sub>, resulta en la formación de agujeros de formas y tamaños irregulares<sup>3</sup>.

La pasta de un queso elaborado con leche pasteurizada al que no se le han adicionado microorganismos para la producción de ojos, debe ser cerrada, puede haber algunos orificios pequeños de contorno irregular que serían de origen mecánico, obtenidos como consecuencia del trabajo con la cuajada y el prensado, a diferencia de los ojos que son de contorno uniforme y producidos por microorganismos<sup>4</sup>.

Existirán aberturas (ojos) cuando la fase acuosa del queso esté saturada en CO<sub>2</sub>, la producción de CO<sub>2</sub> es superior a la difusión hacia el exterior del queso.

---

<sup>2</sup> [http://www.queseriasdearaia.com/queso\\_idiazabal3.htm](http://www.queseriasdearaia.com/queso_idiazabal3.htm)

<sup>3</sup> <http://www.agroinformacion.com/leer-contenidos.aspx?articulo=525>

<sup>4</sup> <http://www.vet.unicen.edu.ar/Tecnologia/Jornadas/Conferencias/Conferencia%20Beatriz%20Coste.doc>

La contribución del CO<sub>2</sub> a la apertura de los quesos dependerá de varios factores:

- Velocidad de formación
- Solubilidad dentro de la pasta del queso en función de la temperatura (CO<sub>2</sub> 50% mas soluble a 10°C que a 20°C y dos veces mas soluble a pH 4,8 que a 5,2)
- Tasa de difusión hacia el exterior del queso<sup>5</sup>

Microorganismos heterofermentativos como *Leuconostoc cremoris* y *St. lactis* var. *diacetylactis* son importantes generadores de gas (CO<sub>2</sub>) afectando la textura del queso (formación de ojos) (Glattli, 1982, citado por DURAN, 1985).

AMIOT (1991), coincide en que en algunos quesos el desarrollo de *Leuconostoc* y/o de lactobacilos heterofermentativos origina la aparición de pequeños ojos en la pasta.

Existe una importante actividad de descarboxilación oxidativa de aminoácidos por medio de los enterococos, lo cual contribuye a la formación de ojos. *Lactobacillus fermentum* (Lb. heterofermentativo obligatorio) es responsable de la formación precoz de gas ocasionando defectos de aperturas irregulares<sup>5</sup>.

## 2.6 Características de las bacterias propiónicas

De acuerdo a la clasificación del Manual de BERGEY'S (2000), las especies pertenecientes al género *Propionibacterium* se presenta como bastones pleomórficos de 0,5 – 0,8 x 1 – 5 μm, con un extremo redondo y el otro puntiagudo, con frecuencia en forma agrupada. Algunas células pueden ser cocoides, bifidas o en racimos, pero no tienen filamentos. Se pueden presentar en forma individual, en pares o cortas cadenas, en configuraciones V o Y ó en grupos con caracteres chinos.

Son organismos grampositivos, sin movilidad, no formadores de esporas. Anaerobios facultativos, pero tienen una aerotolerancia variable. Presentan requerimientos nutricionales complejos, metabolismo fermentativo, produciendo a partir de glucosa y otros carbohidratos grandes cantidades de ácido acético, propiónico y gas. La temperatura óptima de crecimiento es de 30°C a 37°C. Normalmente catalasa positiva.

<sup>5</sup> <http://www.inti.gov.ar/lacteos/pdf/cuaderno.pdf>

Éstas se encuentran principalmente en el queso y productos lácteos, fermentaciones naturales como por ejemplo: ensilajes, fermentaciones olivas y de aceite, y la piel humana. Fácilmente confundidas con algunas especies de *Corynebacterium* o *Clostridium*.

La acción de las bacterias propiónicas tiene lugar durante la etapa de maduración de los quesos en donde realizan la denominada fermentación propiónica, utilizando los carbohidratos, piruvatos y lactatos presentes para producir principalmente ácido propiónico, ácido acético y CO<sub>2</sub>. Habitan normalmente en productos lácteos, piel del hombre y tracto intestinal del hombre y animales. Son catalasa- positivas, anaeróbicas a microaerófilas. La mayoría de las cepas se desarrolla más rápidamente bajo estrictas condiciones anaeróbicas (FAO, 1983; HAVERBECK y JOFRE, 1980).

El Manual de BERGEY'S (2000), sostiene que se han tenido muy buenos resultados en el crecimiento de estas bacterias en un medio de glucosa - extracto de levaduras – tripticasa.

En cuanto a requerimientos nutricionales complejos, necesitan vitaminas pero no tienen problemas en la leche. El sustrato sobre el que se desarrollan es el ácido láctico de la primera fermentación. El ácido láctico lo pasan a pirúvico y éste pasa a ácido propiónico. El CO<sub>2</sub> formado en el paso succinato – piruvato es el responsable de los agujeros en los quesos. Las propionibacterias son capaces también de degradar citratos a diacetilo, que da el aroma a los quesos.

Asimismo, Hettinga y Reinbold (1977), citado por ASTORQUIZA (1987), indican que los requerimientos nutricionales de las propionibacterias se pueden considerar complejos. Los aminoácidos aunque son benéficos no son esenciales, considerando que, ciertas vitaminas, minerales y componentes desconocidos de extractos de levadura son requeridos para el crecimiento y metabolismo. Los mismos autores, sostienen además, que las propionibacterias contienen las peptidasas necesarias requeridas para poder producir los aminoácidos esenciales. La producción de prolina está generalmente asociada con el crecimiento de un gran número de bacterias ácido-propiónicas.

En cuanto al requerimiento vitamínico, Haverbeck y Jofré (1980), citado por ASTORQUIZA (1987), sostienen que la presencia de tiamina ha sido descrita como factor estimulante para el desarrollo de algunas especies de bacterias propiónicas. En efecto, éstas son capaces de sintetizar esta vitamina. La riboflavina a su vez estimula el desarrollo, mas no constituye un requerimiento obligatorio del medio de cultivo. Ácido pantoténico y biotina conforman las vitaminas en cuya ausencia el desarrollo de bacterias propiónicas es limitado notoriamente.

Los requerimientos de minerales han sido estudiados especialmente en relación al cobre, hierro y magnesio. El cobre en concentraciones de 2 a 8 mg/L origina una prolongación en la fase estacionaria de crecimiento y, con ello, un retardo en la producción de ácidos volátiles y anhídrido carbónico. No obstante, este efecto se hace menos significativo a medida que transcurre el período de fermentación. El hierro estimula la producción de ácido propiónico y producción de gas en algunas especies, mientras iones de magnesio y manganeso, conjuntamente con cobalto participan como cofactores en diversas reacciones enzimáticas en la fermentación propiónica (Hettinga y Reinbold, citados por HAVERBECK y JOFRE, 1980)

En algunas ocasiones pueden producir alteraciones superficiales en color, a veces en fisuras en la corteza aparece color rojo-rosado debido a estas bacterias<sup>6</sup>.

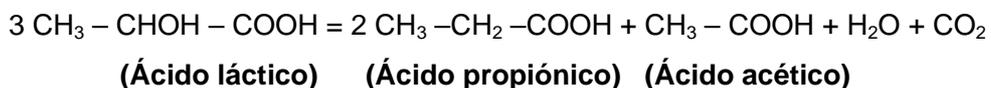
**2.7 Fermentación propiónica.** Según SORDO (1983), los procesos que se desarrollan en el curso de la elaboración del queso dependen de la composición cualitativa y cuantitativa de la microflora acompañante. Desde el punto de vista de la industria quesera, las fermentaciones más importantes son:

- La láctica (formación de ácido láctico)
- La propiónica (formación de ácidos propiónico y acético)
- La butírica (formación de ácido butírico y anhídrido carbónico)

---

<sup>6</sup><http://209.85.165.104/search?q=cache:bq3eauXrsgsJ:tntextreme.galeon.com/uno.htm+bacterias+propi%C3%B3nicas+en+la+leche&hl=es&gl=cl&ct=clnk&cd=23>

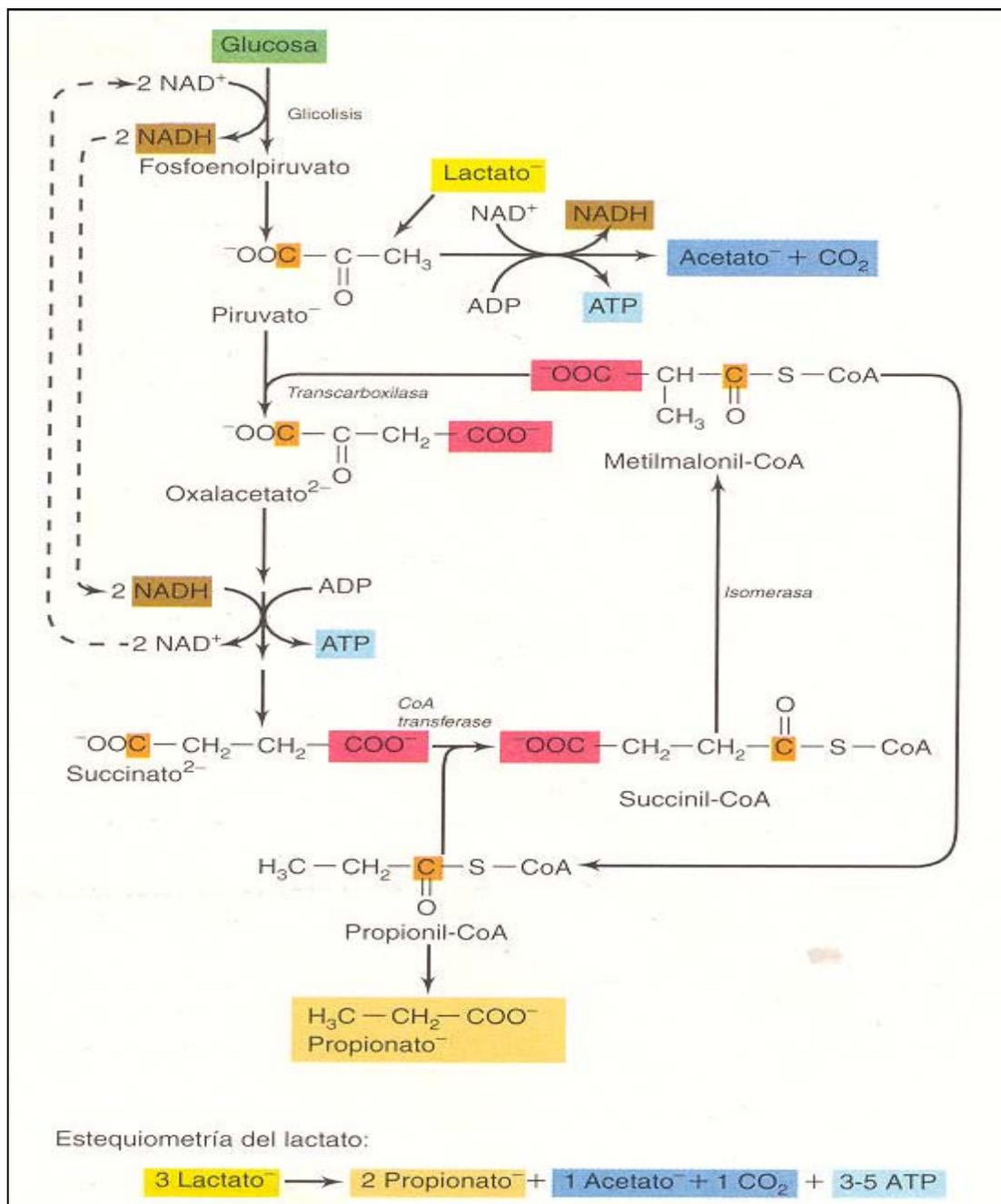
Según ALAIS (1985), el ácido láctico puede experimentar la fermentación propiónica que es la responsable de la formación de ojos en los quesos suizos:



Las bacterias que presentan este tipo de fermentación pueden utilizar tanto azúcares como lactato como puntos de partida para el proceso. La ruta es un proceso complejo en el que se genera acetato, CO<sub>2</sub> y ácido propiónico como productos finales. Es una fermentación secundaria de los productos de las fermentaciones lácticas primarias<sup>7</sup>.

---

<sup>7</sup> <http://209.85.165.104/search?q=cache:GZeL0fY38OkJ:www.unavarra.es/genmic/metabolismo/05respiracion%2520y%2520fermentacion.htm+fermentaci%C3%B3n+propi%C3%B3nica&hl=es&ct=clnk&cd=1&gl=cl>



**FIGURA 1** Fermentación propiónica.

FUENTE: Jaime (2004)<sup>8</sup>.

<sup>8</sup> [http://www.uam.es/personal\\_pdi/ciencias/ljaime/tema2fa.pdf](http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/ljaime/tema2fa.pdf)

### III. MATERIAL Y MÉTODO

#### 3.1 Lugar de ensayo

El estudio se llevó a cabo en la empresa “Prolesur S.A. “, ubicada en la ciudad de Los Lagos, X región. Los muestreos y sus correspondientes análisis microbiológicos fueron realizados en dependencias de dicha empresa.

#### 3.2 Materiales

Los materiales y equipos utilizados tanto en la toma de muestras como en el análisis microbiológico fueron proporcionados por la empresa y se detallan a continuación:

- Microscopio
- Botellas de polipropileno de 250 ml
- Agitador tipo Vortex “Termolyne”
- Pipetas de 2 y 5 ml estériles
- Frascos Schott de 250 ml
- Tubos de ensayo de 16 x 160 mm
- Gradillas para tubos de ensayo
- Probeta graduada de 100 ml
- Bolsas de polietileno estériles para agitador Stomacher
- Homogenizador Stomacher 400 “Seward”
- Baño María termoregulado a  $45 \pm 1^\circ \text{C}$
- Balanza de precisión “Sartorius” (d= 0.1 mg)
- pH – metro “HANNA” modelo 211
- Estufa “Memert”
- Jarra de anaerobiosis (Oxoid)
- Autoclave “Orthmann”
- Refrigerador

- Tinas redondas de acero inoxidable de doble pared, automatizadas, con una capacidad de 16.500 L.

**3.2.1 Materias primas.** Para la elaboración de los quesos la empresa se abastece de leche proveniente de áreas rurales cercanas a las ciudades de Los Lagos, Osorno y Temuco, además de concentrado proteico de leche proveniente de Osorno. (Concentrado proteico descremado 8,5 % Prot.)

**3.2.2 Reactivos.** Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Diluyente: Buffer fosfato (Solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  al 0,0425 ppm con pH ajustado a 7,2). Para muestras líquidas.
- Diluyente: Buffer citrato (Solución de  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$  de 20 g/L). Para muestras de queso.
- Lactato de sodio (Merck)
- Fosfato dipotásico (Merck)
- Sulfato de magnesio 7  $\text{H}_2\text{O}$  (Merck)
- Agar Soya Tríplica (BD)
- Extracto de levadura (Merck)
- Agar bacteriológico (OXOID)
- Indicador Anaerotest (Merck)
- Anaerocult A (Merck)

### 3.3 Metodología

**3.3.1 Método de muestreo.** Se definió una secuencia de muestreo dentro de la línea de elaboración del queso tipo Gauda, la cual incluye 5 puntos: leche cruda en el silo, leche pasteurizada a la caída de tina, queso a la salida de prensa, queso a la salida de saladero y finalmente queso con 30 días de maduración. Además, se incluyó, una muestra de concentrado proteico de leche (CPL), usado en la estandarización de la leche destinada a la elaboración de quesos. Las muestras de CPL se tomaron según la disponibilidad de éste, diferenciándose por fechas de muestreo.

En una etapa preliminar, las leches utilizadas como materia prima se almacenan en conjunto en un silo para comenzar con la secuencia antes mencionada, de acuerdo a la línea de flujo de la empresa (ANEXO 1). En esta etapa se realizaron tres repeticiones (tres fechas de elaboración distintas).

En la segunda etapa las leches no se almacenan en un mismo silo como es de costumbre, sino que se separan a su llegada a la planta en un silo destinado especialmente, desde ahí se comienza con la secuencia de muestreo, con el fin de obtener un queso elaborado totalmente con cada una de las leches utilizadas como materia prima por separado. Se realizaron 5 repeticiones (5 fechas de elaboración distintas) de la secuencia de muestreo, para cada una de las diferentes leches utilizadas: Los Lagos, Temuco y Osorno, es decir, un total de 15 secuencias de muestreo.

En el CUADRO 5 se indican los puntos de muestreo dentro de la línea de elaboración del queso tipo Gauda y el número de muestras para cada tipo de leche utilizada.

**CUADRO 5 Puntos y número de muestras dentro de la línea de elaboración del queso tipo Gauda**

Nº muestras	SECUENCIA DE MUESTREO					Total muestras/ fechas Elab.
	Leche cruda /silo	Leche pasteurizada /caída de tina	Queso / salida de prensa	Queso / salida de saladero	Queso / 30 días de maduración	
Leche Los Lagos	5	5	5	5	5	25
Leche Temuco	5	5	5	5	5	25
Leche Osorno	5	5	5	5	5	25

Los muestreos se efectuaron entre el 30 de Octubre de 2006 y el 02 de febrero de 2007, según la disponibilidad de la materia prima. Se identificó cada muestreo con la fecha de elaboración y el número de tina correspondiente con fin de seguir la secuencia. Se tomaron fotografías de los quesos con 30 días de maduración (ANEXO 9). El proceso se realizó según los parámetros establecidos por la empresa.

**3.3.1.1 Muestras líquidas.** Las muestras de leche cruda, pasteurizada y CPL se tomaron según el método descrito en NCh 1011.1 (1998). En el caso de las muestras de leche cruda y CPL, se tomaron directamente desde el silo de almacenamiento, en botellas estériles (250 ml), recolectándose aproximadamente 100 ml de muestra en forma aséptica. La muestra de leche pasteurizada se tomó a la caída de tina en botellas estériles (250 ml), recolectándose aproximadamente 100 ml de muestra en forma aséptica. En caso que las muestras líquidas no se pudieran procesar en el momento, se mantenían refrigeradas entre 2° y 5° C hasta el momento de efectuar el análisis. Una vez refrigerada, la muestra se mantenía en estas condiciones por un tiempo máximo de 18 horas.

**3.3.1.2 Muestras sólidas.** Las muestras de queso, tanto en la salida de prensa y saladero como en el queso madurado, se tomaron de acuerdo al método descrito en NCh 1011.2 (1980). Para la toma de muestras de salida de prensa y saladero se realizaron dos cortes paralelos a los lados del queso, almacenándolo luego en una bolsa estéril. En el caso de la muestra con 30 días de maduración, se introdujo una sonda perpendicularmente por una de las caras del queso, pasando por el centro, hasta alcanzar la cara opuesta. Las partes externas del cilindro resultante se utilizaron para tapar el agujero hecho en el queso. Posteriormente la muestra se almacenó en una bolsa estéril.

**3.3.1.3 Dilución de las muestras.** La preparación y dilución de las muestras se realizó según el método descrito por AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA), (1992). En el caso de las muestras líquidas se tomaron 11 ml de leche diluyéndola en 99 ml de buffer fosfato previamente refrigerado, obteniendo así la dilución  $10^{-1}$ . Para las muestras de queso se pesaron 11 g de éste y se mezclaron, por no más de 15 minutos, con 99 ml de buffer citrato previamente calentado a 45 °C en Baño María , traspasando posteriormente la muestra a bolsa de Stomacher para su homogenización a velocidad alta, durante 2 minutos, obteniéndose la dilución  $10^{-1}$  . Luego se realizaron diluciones adicionales dependiendo del tipo de muestra (ver ANEXO 2).

### **3.3.2 Métodos de análisis**

Se inició el estudio, determinando la presencia de bacterias formadores de gas, usando la técnica de Weinzirl, posteriormente se realizó el recuento de bacterias en la materia prima. A las colonias obtenidas en este recuento se les aplicó la prueba de la catalasa y luego fueron aisladas e incubadas nuevamente en anaerobiosis y aerobiosis, con el fin de determinar su aerotolerancia. Al finalizar la incubación se realizó nuevamente la prueba de la catalasa. Además se efectuó la tinción de Gram a cada una de las colonias identificadas. Las tinciones se hicieron a los 5 y 10 días de incubación, presentando iguales resultados.

**3.3.2.1 Técnica de Weinzirl.** La técnica de Weinzirl o método de la parafina sólida se llevó a cabo con el fin de determinar la presencia de bacterias formadoras de gas. Esta técnica consiste en agregar 0,5 a 1 ml de parafina derretida o aproximadamente 1g de parafina sólida a 5 tubos de ensayo, los cuales se tapan y se esterilizan en autoclave a 121°C por 15 minutos. Una vez enfriados los tubos, se agrega a cada uno, 5 ml de leche, posteriormente se llevan a un baño María a 80°C por 15 minutos y luego se enfrían a temperatura ambiente. Finalmente, se incuban a 37°C por un período máximo de 5 días en los cuales se observa en cada tubo, el levantamiento del tapón de parafina, lo que indica formación de gas. Se considera la muestra positiva a presencia de bacterias anaeróbicas formadoras de gas, si 2 de los 5 tubos muestran formación de gas (FAO, 1981).

**3.3.2.2 Recuento de bacterias propiónicas.** El recuento de bacterias propiónicas se realizó en medio de cultivo YELA (Agar lactato – extracto de levadura), para bacterias propiónicas. Este se preparó según la formulación indicada en el CUADRO 6.

**CUADRO 6 Formulación medio de cultivo YELA**

Ingredientes	Cantidad
Lactato de sodio	10,0 g
Fosfato dipotásico	0,25 g
Sulfato de magnesio 7 H <sub>2</sub> O	0,05 g
Soya Tripticasa	10,0 g
Extracto de levadura	10,0 g
Agar bacteriológico	20,0 g
Agua destilada	1000 ml

FUENTE: CITIL – INTI<sup>9</sup>.

Después de disolver los ingredientes en 1 L. de agua destilada se ajustó pH a  $7.0 \pm 0.1$  y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos y se enfrió en Baño María a 45 °C antes de su uso. La siembra se hizo en profundidad mezclando el medio con la muestra diluida en una placa petri estéril. Luego de solidificada la mezcla, las placas se incubaron a 32°C por 7 – 11 días en jarra de anaerobiosis (con 11 días de incubación hay un mejor desarrollo de las bacterias). Los límites de detección van de 10 colonias como mínimo, hasta 300 como máximo<sup>9</sup>.

**3.3.2.3 Prueba de la Catalasa.** Esta prueba se usó para comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativa, como es el caso de las bacterias propiónicas. Se llevó a cabo a través del método del portaobjetos con peróxido de hidrógeno al 5% FAO (1981).

**3.3.2.4 Tinción de Gram.** La tinción de Gram se aplicó a las colonias catalasa positiva, con el fin de reconocer en ellas, las características morfológicas celulares de las bacterias propiónicas y su característica de ser microorganismos grampositivos. La técnica se realizó según el protocolo descrito en FAO (1981).

<sup>9</sup> INTI, CITIL. Medio de cultivo YELA para bacterias propiónicas. Correo personal. <ivanapal@inti.gov.ar>. (11/09/2006).

### **3.4 Análisis de resultados**

Para el análisis estadístico, los resultados de los recuentos realizados, fueron transformados a  $\text{Log}_{10}$ .

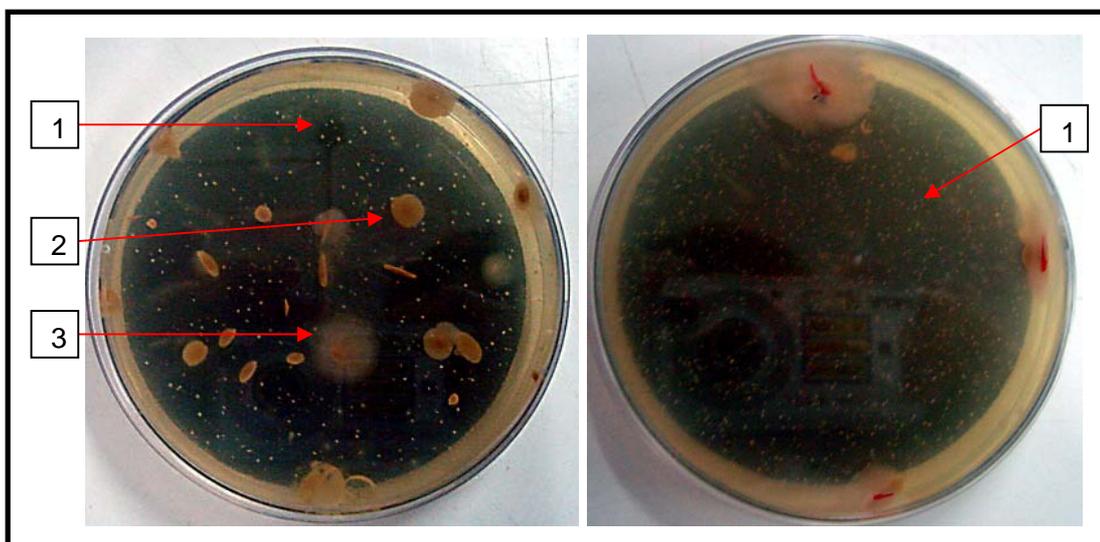
A los resultados obtenidos de recuento de bacterias propiónicas en cada punto de muestreo, se les aplicó un análisis de variancia, con el fin de detectar diferencias estadísticamente significativas. En los casos en que hubo diferencias significativas, se aplicó el test de rango múltiple (test de Tukey), para determinar entre que puntos existía diferencia.

Los análisis realizados se efectuaron utilizando el software estadístico "Statistical Graphics Plus 5.1 para Windows".

#### IV. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

##### 4.1 Identificación de bacterias propiónicas

Con el fin de comprobar la presencia de bacterias formadoras de gas, el primer paso fue realizar la técnica de Weinzirl en la leche utilizada como materia prima. Las cuatro muestras analizadas, leche de Los Lagos, Temuco, Osorno y CPL presentaron más de dos tubos con levantamiento del tapón de parafina en menos de 5 días, por lo tanto se consideraron como muestras positivas. La técnica se repitió en dos fechas diferentes obteniéndose iguales resultados en ambas ocasiones.



**FIGURA 2** Colonias de bacterias propiónicas identificadas. (1) colonias pequeñas. (2) colonias con centro más oscuro que semejan un núcleo. (3) colonias con presencia de halo.

Posteriormente se realizó un primer recuento de bacterias propiónicas en la leche cruda utilizada como materia prima. Pudo observarse el crecimiento de colonias lenticulares, de tamaño pequeño con bordes regulares, color blancuzco y consistencia cremosa. Si bien la gran mayoría de las colonias desarrolladas fueron semejantes entre sí, hubo algunas que se diferenciaron en características tales como el tamaño, color y presencia de halo, como se puede observar en la FIGURA 2. Estas características se repitieron en todas las muestras analizadas.

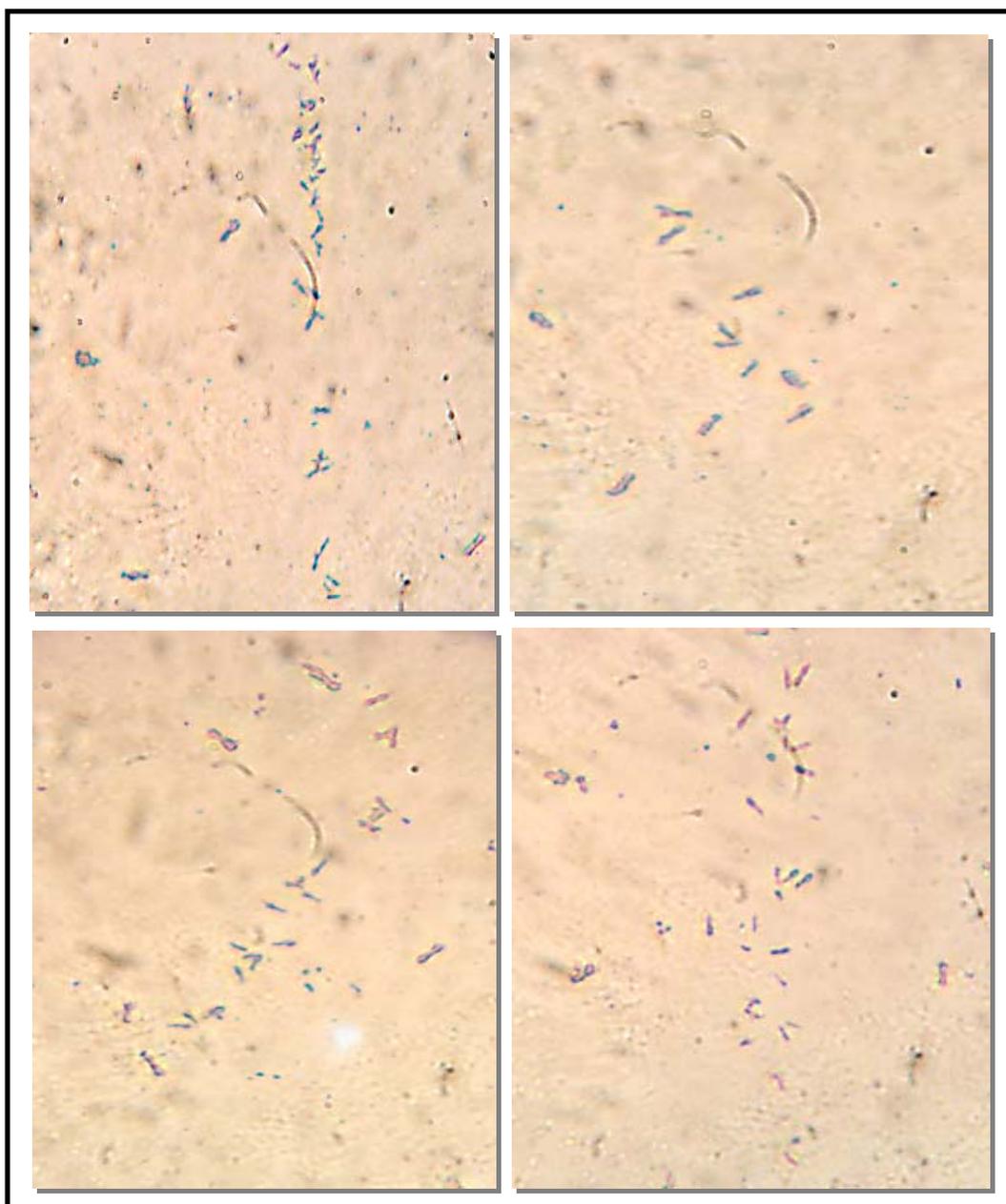
Luego de realizar la prueba de la catalasa a cada una de las colonias identificadas, fueron aisladas e incubadas nuevamente bajo condiciones anaeróbicas y aeróbicas. Las placas bajo condición aeróbica, se sobre poblaron a las 24 horas, por lo tanto se repitió la siembra y se volvió a incubar a 32 °C, observándose desarrollo de colonias a las 48 horas, determinándose una aerotolerancia variable.

**CUADRO 7 Resultados prueba de la catalasa para cada tipo de colonia**

Condición de incubación	Prueba de la catalasa		
	Colonia 1	Colonia 2	Colonia 3
1ª incubación/ anaerobiosis	-	+	+
2ª incubación/ anaerobiosis	+	+	+
1ª y 2ª incubación/ Aerobiosis	+	+	+

Como se observa en el CUADRO 7, los resultados de la prueba de la catalasa fueron positivos en todos los casos, con excepción de la colonia 1 de la primera incubación anaeróbica. Esto podría explicarse a que no se le realizó la prueba a estas colonias inmediatamente, si no que se hizo con un tiempo de más de 2 días desde la lectura de las placas, pudiendo entonces arrojar un falso resultado.

A cada una de las colonias obtenidas se le efectuó la tinción de Gram observándose, en la gran mayoría, bastones cortos y finos, algunos con terminaciones redondas, en forma individual, en pares y agrupados, con configuraciones V e Y, y caracteres chinos en algunos casos, coincidiendo con las disposiciones típicas de células de *Propionibacterium*, todos Gram positivos. En el caso de las colonias incubadas aeróbicamente, éstas concuerdan en algunos aspectos mencionados anteriormente, sin embargo se observan además, cocos agrupados en pequeños racimos, Gram positivos. En la FIGURA 3 se pueden observar los resultados de las tinciones obtenidos de colonias incubadas anaeróbicamente.

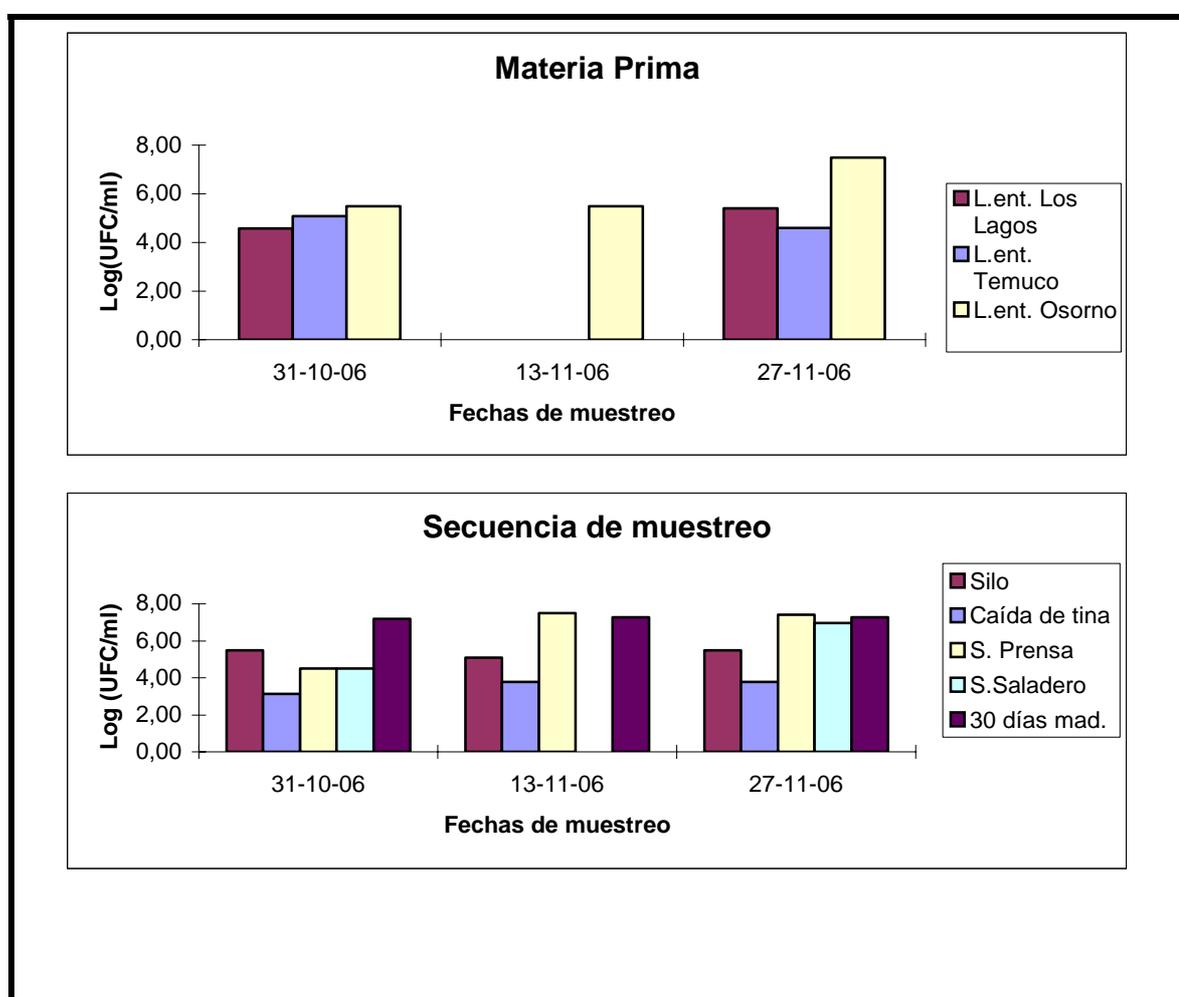


**FIGURA 3** *Propionibacterium* sp. Tinción de Gram mostrando las disposiciones típicas de las células.

#### 4.2 Recuento de bacterias propiónicas dentro de la línea de elaboración del queso tipo Gauda

A continuación se presentan los recuentos de bacterias propiónicas dentro de la línea de elaboración del queso tipo Gauda en las dos etapas de muestreo realizadas, expresados como logaritmo de unidades formadoras de colonias ufc/ml.

**4.2.1 Recuento de bacterias propiónicas en la etapa preliminar de muestreo.** En la FIGURA 4 se muestra el recuento de bacterias propiónicas en las 3 fechas de elaboración que se realizaron.



**FIGURA 4** Recuento de bacterias propiónicas en la etapa preliminar de muestreo

En la FIGURA 4 se aprecia que la leche entera de Temuco en la segunda fecha de muestreo no registra recuento, debido a que no se recibió leche de este origen. Para los casos de leche entera de Osorno y queso a la salida de saladero, no se tiene recuentos debido a que no se produjo la anaerobiosis por problemas con la jarra utilizada, por lo tanto no fueron validados sus resultados. Como se aprecia en el gráfico correspondiente a materia prima, los recuentos de bacterias propiónicas estuvieron cercanos a Log 5,0 ufc/ml, obteniéndose en la primera fecha de muestreo, el recuento más bajo en la leche procedente de Los Lagos con Log 4,58 ufc/ml ( $3,8 \times 10^4$ ) y en la de Osorno el valor más alto, con Log 5,49 ufc/ml ( $3,1 \times 10^5$ ). En la tercera fecha aumentó considerablemente los recuentos en la leche proveniente de Osorno con Log 7,49 ufc/ml ( $3,1 \times 10^7$ ), sin embargo, el análisis de varianza arrojó que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre las distintas leches (ANEXO 3.1.1).

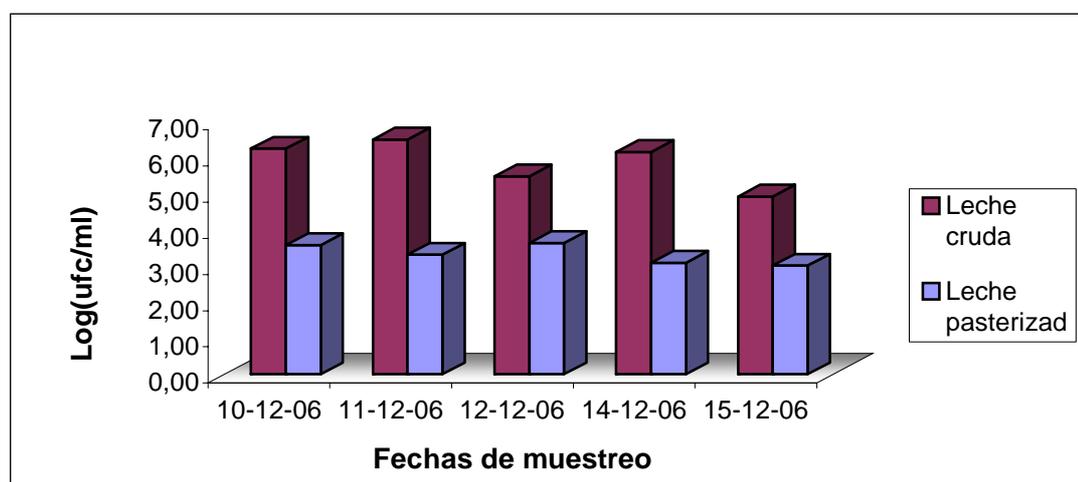
En cuanto al Gráfico de Secuencia de Muestreo (FIGURA 4), se puede observar una clara disminución del recuento después del tratamiento térmico, con un promedio de Log 3,6 ufc/ml, sin embargo, en el queso a la salida de prensa, aumenta nuevamente y se mantiene luego de pasar por la salmuera y a los 30 días de maduración, con excepción de la primera fecha, en donde se incrementa en el último punto. Los recuentos en general, son cercanos a Log 7,0 ufc/ml. El análisis de varianza arrojó diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ). El Test de rango múltiple indica que dichas diferencias se dan entre la caída de tina y salida de prensa, saladero y 30 días de maduración, además entre la leche del silo y el queso con 30 días de maduración (ANEXO 3.2.1).

**4.2.2 Recuento de bacterias propiónicas en la segunda etapa de muestreo.** A continuación se muestran los resultados obtenidos de los recuentos de bacterias propiónicas realizados en la segunda etapa, en la cual, como se mencionó anteriormente, se separó la materia prima de acuerdo a su lugar de origen para la posterior fabricación del queso.

**4.2.2.1 Recuento de bacterias propiónicas utilizando leche proveniente de Los Lagos.**

- **Leche cruda en el silo y pasterizada a caída de tina.**

En la FIGURA 5 se presentan los recuentos de bacterias propiónicas para leche cruda y posteriormente pasterizada, realizados en 5 diferentes fechas de elaboración.

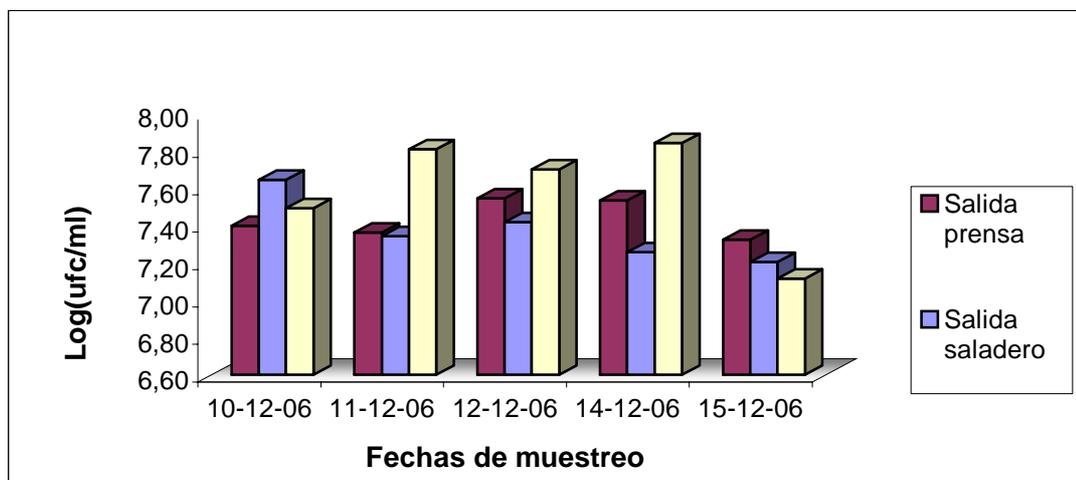


**FIGURA 5 Comparación del recuento de bacterias propiónicas en leche cruda y pasterizada de Los Lagos.**

El promedio de los recuentos de bacterias propiónicas en leche cruda fue de Log 6,11 ufc/ml, registrándose el valor mas alto en el segundo muestreo (11-12-06) con Log 6,48 ufc/ml ( $3,0 \times 10^6$ ) y el mas bajo en el quinto muestreo (15-12-06) con un valor de Log 4,90 ufc/ml ( $8,0 \times 10^4$ ). Los recuentos de bacterias propiónicas en leche pasterizada presentaron un promedio de Log 3,38 ufc/ml, obteniéndose el valor más alto en el tercer muestreo (12-12-06) con Log 3,62 ufc/ml y el más bajo, coincidiendo con la leche antes del tratamiento, en el quinto muestreo con un valor de Log 3,00 ufc/ml. De acuerdo al análisis de varianza realizado, existe diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) entre la leche cruda y pasterizada de origen Los Lagos (ANEXO 4.2).

- **Queso a la salida de prensa, salida de saladero y con 30 días de maduración**

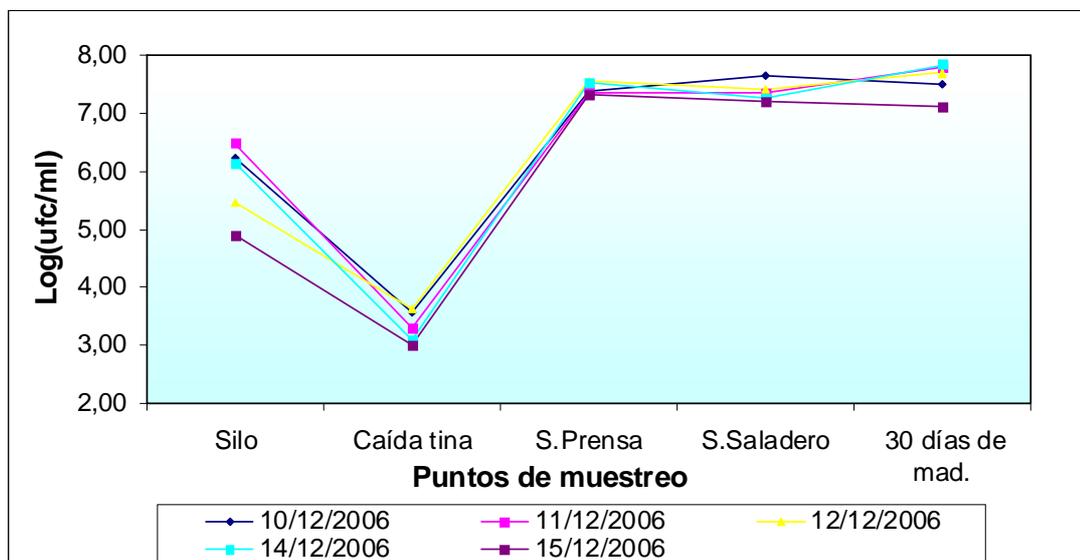
En la FIGURA 6 se presentan los recuentos de bacterias propiónicas en el queso, correspondientes a las 5 fechas de elaboración.



**FIGURA 6** Comparación de recuento de bacterias propiónicas en queso a la salida de prensa, salida de saladero y con 30 días de maduración, elaborado con leche proveniente de Los Lagos.

El queso a la salida de prensa ya muestra un aumento considerable en los recuentos de bacterias propiónicas, presentándose todos los valores sobre Log 7,00 con un promedio de Log 7,44 ufc/ml ( $2,76 \times 10^7$ ). Luego de pasar por el saladero los recuentos se mantienen dentro del mismo rango de valores con un promedio de Log 7,40 ufc/ml ( $2,25 \times 10^7$ ), observándose un aumento en el recuento de bacterias sólo en la primera fecha y en las demás una leve disminución. En cuanto al queso, maduro se observa un aumento en la mayoría de las fechas (Log 7,8), con excepción de la primera y la última en donde disminuyen ligeramente con respecto al queso a la salida del saladero. De acuerdo al análisis de varianza, no existen diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre los quesos analizados. (ANEXO 4.2)

En la FIGURA 7 se puede ver la evolución de los recuentos de bacterias propiónicas en los distintos muestreos realizados con materia prima proveniente de Los Lagos en las cinco fechas de elaboración.



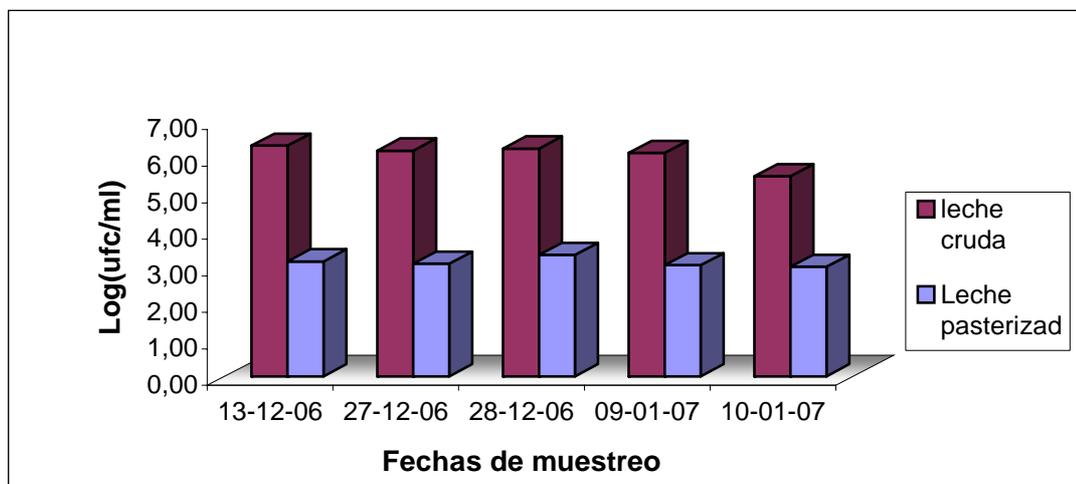
**FIGURA 7** Tendencia del recuento de bacterias propiónicas durante los muestreos realizados con leche proveniente de Los Lagos.

El análisis de varianza realizado arrojó que no existe diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0,05$ ) entre las diferentes fechas de elaboración para la secuencia de muestreos (ANEXO 4.2).

#### 4.2.2.2 Recuento de bacterias propiónicas utilizando leche proveniente de Temuco.

- **Leche cruda en el silo y leche pasteurizada a caída de tina.**

En la FIGURA 8 se presenta los recuentos de bacterias propiónicas realizados en 5 diferentes fechas de elaboración para leche cruda y posteriormente pasteurizada.



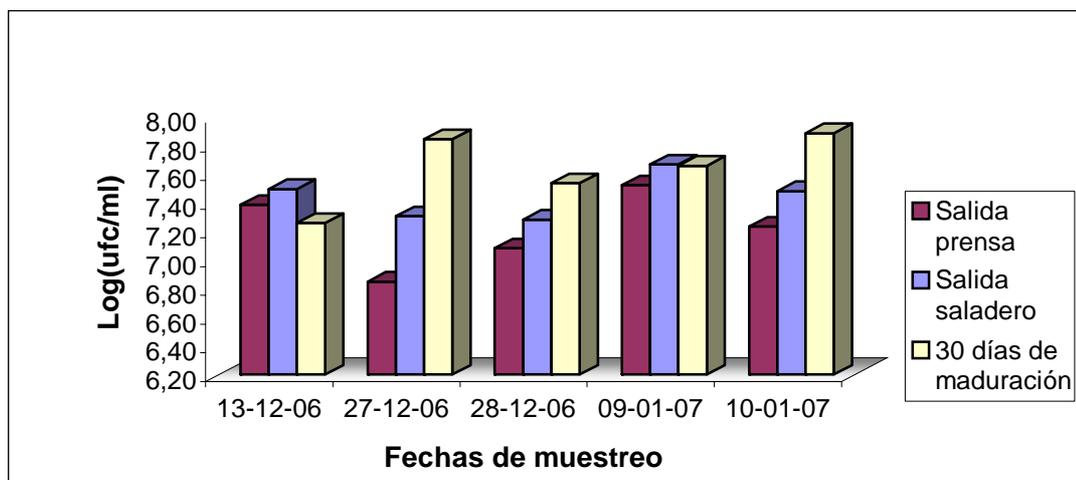
**FIGURA 8 Comparación del recuento de bacterias propiónicas en leche cruda y pasterizada de Temuco.**

Se puede observar que los recuentos de bacterias propiónicas en leche cruda estuvieron cercanos a Log 6,0 ufc/ml con un promedio de Log 6,14 ufc/ml, registrándose el valor más alto en el primer muestreo (13-12-06) con Log 6,31 ufc/ml ( $2,05 \times 10^6$ ) y el más bajo en el quinto muestreo (10-01-07) con un valor de Log 5,48 ufc/ml ( $3,0 \times 10^5$ ). Los recuentos fueron disminuyendo entre cada fecha de muestreo bajando considerablemente en el quinto muestreo.

Los recuentos de bacterias propiónicas en leche pasterizada estuvieron cercanos a Log 3,0 ufc/ml con un promedio de Log 3,13 ufc/ml, obteniéndose el valor más alto en el tercer muestreo (28-12-06) con Log 3,32 ufc/ml y el más bajo, en el quinto muestreo al igual que la leche antes del tratamiento, con un valor de Log 3,00 ufc/ml. De acuerdo al análisis de varianza realizado, existe diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) entre la leche cruda y pasterizada de origen Temuco. (ANEXO 5.2)

- **Quesos a la salida de prensa, salida de saladero y con 30 días de maduración**

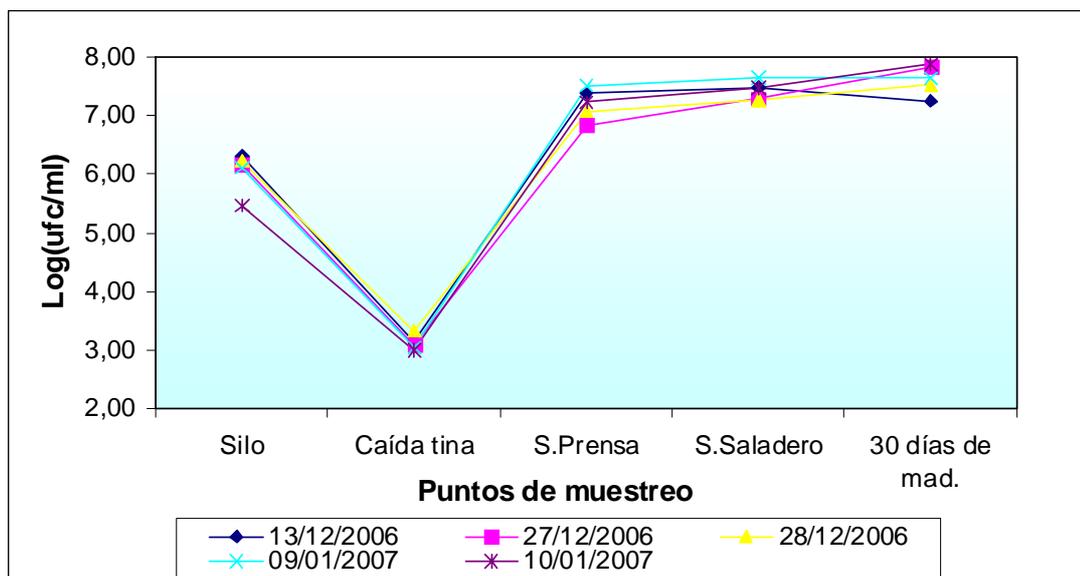
En la FIGURA 9 se presenta los recuentos de bacterias propiónicas para el queso, realizados en 5 diferentes fechas de elaboración.



**FIGURA 9 Comparación de recuento de bacterias propiónicas en quesos a la salida de prensa, salida de saladero y con 30 días de maduración, elaborado con leche proveniente de Temuco.**

A la salida de prensa los recuentos de bacterias propiónicas en el queso superan considerablemente a la leche después del tratamiento, con un promedio de Log 7,27 ufc/ml ( $1,86 \times 10^7$ ). Si bien los valores para la salida de saladero son similares se percibe un aumento en el recuento, en la mayoría de las fechas, con un promedio de Log 7,47 ufc/ml ( $2,92 \times 10^7$ ). El queso con 30 días de maduración presentó los recuentos más altos en la segunda y quinta fecha de muestreo con valores cercanos a Log 7,90, aumentando con respecto a la salida de saladero, salvo en la primera fecha. El análisis de varianza realizado arrojó que existe diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) entre los quesos analizados. El Test de rango múltiple arrojó que existen diferencias entre el queso a la salida de prensa y los treinta días de maduración (ANEXO 5.2).

En la FIGURA 10 se puede ver la evolución de los recuentos de bacterias propiónicas en los distintos muestreos realizados con materia prima proveniente de Temuco en las cinco fechas de elaboración.



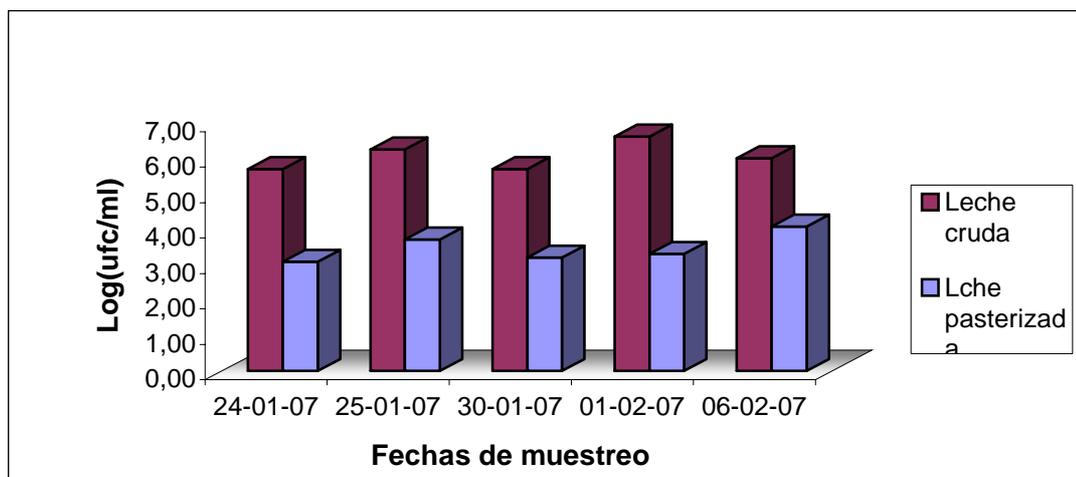
**FIGURA 10** Tendencia del recuento de bacterias propiónicas durante los muestreos realizados con leche proveniente de Temuco.

El análisis de varianza realizado arrojó que no existe diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0,05$ ) entre las diferentes fechas de elaboración para la secuencia de muestreos (ANEXO 5.2).

#### 4.2.2.3 Recuento de bacterias propiónicas utilizando leche proveniente de Osorno.

- **Leche cruda en el silo y leche pasteurizada a caída de tina.**

En la FIGURA 11 se presenta los recuentos de bacterias propiónicas realizados en 5 diferentes fechas de elaboración para leche cruda y posteriormente pasteurizada.

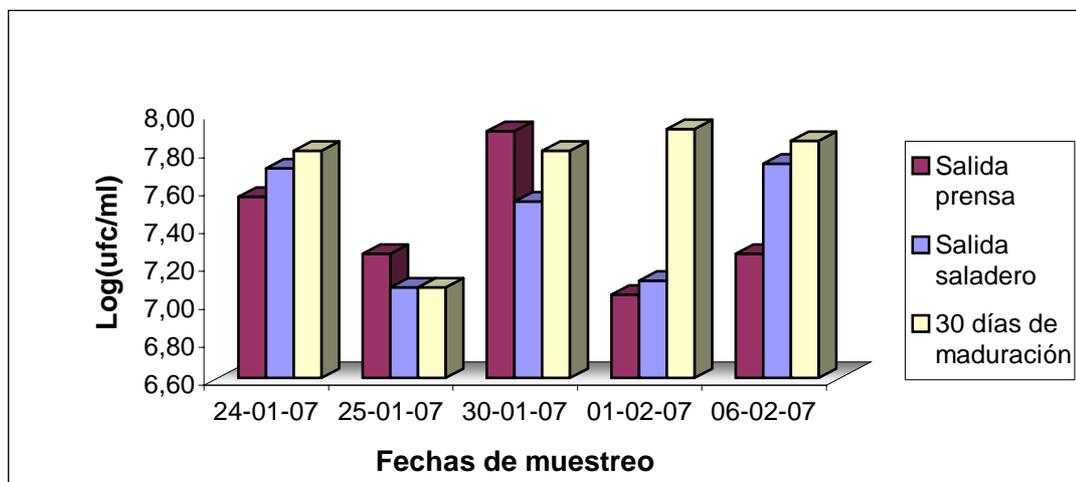


**FIGURA 11 Comparación del recuento de bacterias propiónicas en leche cruda y pasterizada de Osorno.**

Como se puede observar el comportamiento de los recuentos de bacterias propiónicas para la leche de Osorno antes y después del tratamiento coincide con las demás leches analizadas, presentando la leche cruda valores cercanos a Log 6,0 ufc/ml con un promedio de Log 6,20 ufc/ml ( $1,58 \times 10^6$ ), y la leche pasterizada un promedio de Log 3,64 ufc/ml ( $4,4 \times 10^3$ ), obteniéndose el valor más alto en el quinto muestreo (06-02-07) con Log 4,08 ufc/ml, no así la leche cruda cuyo valor más alto se obtuvo en el cuarto muestreo (01-02-07) con Log 6,61 ufc/ml. El análisis de varianza realizado arrojó que existe diferencia estadísticamente significativa entre la leche cruda y pasterizada de origen Osorno ( $P < 0,05$ ) (ANEXO 6.2).

- **Quesos a la salida de prensa, salida de saladero y con 30 días de maduración**

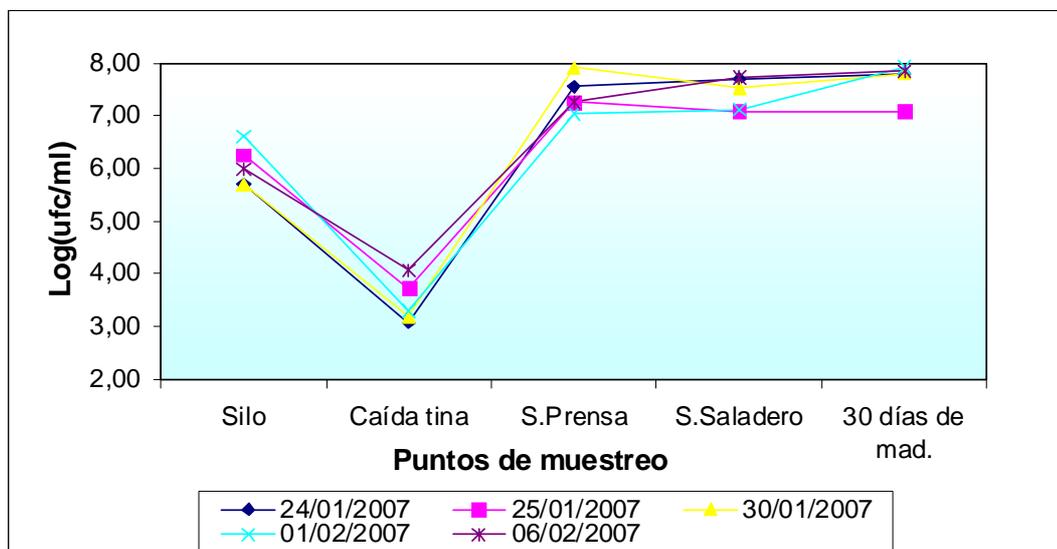
En la FIGURA 12 se presenta los recuentos de bacterias propiónicas para el queso, realizados en 5 diferentes fechas de elaboración.



**FIGURA 12** Comparación de recuento de bacterias propiónicas en quesos a la salida de prensa, salida de saladero y con 30 días de maduración, elaborado con leche proveniente de Osorno.

Si bien los recuentos de bacterias propiónicas en el queso a la salida de prensa aumentaron al igual que en los demás casos, se observa que en el cuarto y quinto muestreo el aumento es muy leve comparado con los demás. El queso a la salida de prensa presenta un promedio de Log 7,51 ufc/ml ( $3,26 \times 10^7$ ), muy similar al de la salida de saladero con Log 7,52 ufc/ml ( $3,28 \times 10^7$ ). A los 30 días de maduración los recuentos se acrecentaron semejantes a las demás leches teniendo los recuentos más altos en la cuarta y quinta fecha de muestreo con valores cercanos a Log 7,91, por lo tanto, no tuvo influencia la disminución en los recuentos a la salida de prensa. El análisis de varianza realizado arrojó que no existe diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0,05$ ) entre los quesos analizados (ANEXO 6.2).

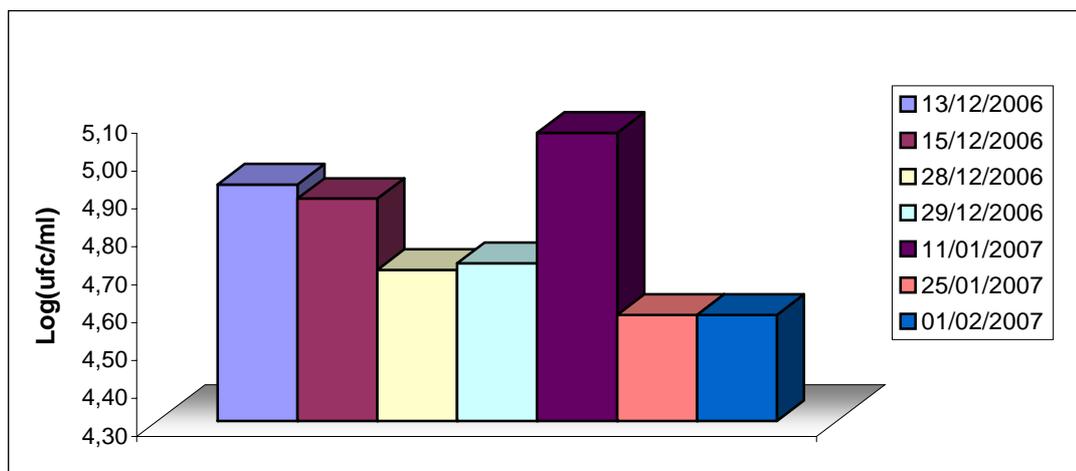
En la FIGURA 13 se puede ver la evolución de los recuentos de bacterias propiónicas en los distintos muestreos realizados con materia prima proveniente de Osorno en las cinco fechas de elaboración.



**FIGURA 13** Tendencia del recuento de bacterias propiónicas durante los muestreos realizados con leche proveniente de Osorno.

El análisis de varianza realizado arrojó que no existe diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0,05$ ) entre las diferentes fechas de elaboración para la secuencia de muestreo (ANEXO 6.2).

**4.2.2.4 Recuento de bacterias propiónicas en concentrado proteico de leche.** En la FIGURA 14 se muestra el recuento de bacterias propiónicas del CPL en las diferentes fechas en que fue analizado, expresados como logaritmo de unidades formadoras de colonias ufc/ml (ANEXO 7.1).

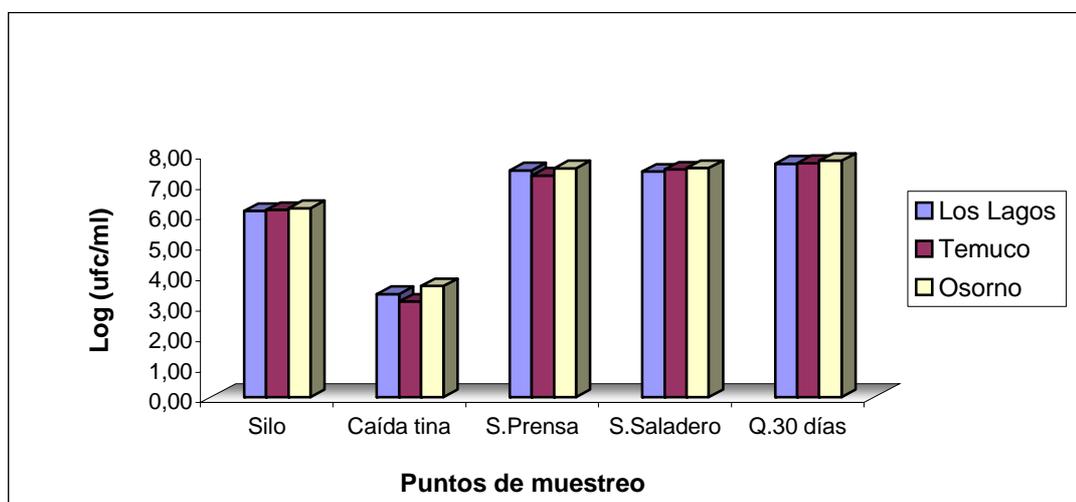


**FIGURA 14 Comparación de recuentos de bacterias propiónicas en concentrado proteico de leche en distintas fechas de muestreo.**

El concentrado proteico de leche presento valores por debajo de la leche cruda y los demás puntos de muestreo, a excepción de la leche después de pasteurizada, la cual registra valores aún menores (Log 3,4 ufc/ml). Se puede observar que el valor mas bajo fue de Log 4,58 ufc/ml ( $3,8 \times 10^4$ ) en las dos últimas fechas y el más alto en la quinta fecha con Log 5,06 ufc/ml ( $1,15 \times 10^5$ ), obteniendo un promedio de Log 4,81 ufc/ml.

El CPL fue usado en dos fechas de elaboración para cada leche analizada, en la 4<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup> fecha de elaboración con leche procedente de Los Lagos, en la 3<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup> fecha de elaboración con leche de Temuco y en la 2<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> fecha de elaboración con leche de Osorno. Se puede concluir que no tiene mayor influencia en los recuentos de bacterias propiónicas en la leche cruda y su posterior transformación, ya que no hubo diferencia con las demás fechas de elaboración, en las cuales no se usó en la estandarización de la leche destinada a quesería. Este comportamiento se repitió con las tres leches analizadas, y no hubo diferencia estadísticamente significativa entre fechas de elaboración, con un 95% de confianza.

En la FIGURA 15 se presentan los promedios de recuentos de bacterias propiónicas, en cada punto de muestreo, con leches provenientes de Los Lagos, Temuco y Osorno. (ANEXO 8.1)



**FIGURA 15 Comparación del promedio de recuento de bacterias propiónicas en los puntos de muestreo, con leche de Los Lagos, Temuco y Osorno.**

En la FIGURA 15 se observa una congruencia entre los promedios para cada punto de muestreo. Esto es corroborado por el análisis de variancia el cual arrojó que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las diferentes leches analizadas en cada punto de muestreo, esto con un 95% de confianza (ANEXO 8.2).

Habitualmente, las bacterias propiónicas están presentes en la leche en diferente concentración siendo variable según la estación del año<sup>8</sup>.

De acuerdo a los resultados se observa que no hubo una tendencia clara en los recuentos de bacterias propiónicas para la leche antes del tratamiento térmico, entre las distintas fechas de elaboración, lo cual podría deberse a que no siempre se almacenó leche del mismo número de predios. Sin embargo, al comparar los promedios de recuentos para la leche cruda de los distintos orígenes, esta diferencia no es estadísticamente significativa ( $P > 0,05$ ), por lo tanto no se podría diferenciar entre una y otra en cuanto al aporte de bacterias propiónicas.

Los recuentos de bacterias propiónicas en la leche pasteurizada son considerablemente menores a los resultados obtenidos en la leche antes del tratamiento, lo que es de esperar, ya que uno de los objetivos del tratamiento térmico es reducir la carga microbiana inicial de la leche. Esto ocurre en los tres casos analizados.

Con la pasteurización se logra una leche más uniforme desde el punto de vista bacteriológico, 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).

AMIOT (1991), señala que un aspecto fundamental de la calidad de la leche es su flora microbiana. Desde el punto de vista cuantitativo, se considera que las leches con bajos niveles de población son de mejor calidad. Además del número, el tipo de microorganismos presentes en la leche también influye tanto en el aspecto higiénico como en el de la transformación. La calidad real de un producto lácteo, es el resultado directo de la calidad bacteriológica de la leche de la que procede.

Si bien el tratamiento térmico puede reducir la carga propiónica inicial, es evidente que no se logra en su totalidad, ya que a medida que avanza la transformación, aumenta nuevamente incluso sobrepasando los valores iniciales de la leche sin tratamiento térmico. Aunque su temperatura óptima es de 30° C, algunas bacterias propiónicas sobreviven tratamientos térmicos de 76°C por 10 segundos (HAVERBECK y JOFRE, 1980), pudiendo sobrevivir a la pasteurización.

La mejora de la calidad bacteriológica de las leches, mediante el tratamiento térmico y la bacterofugación reducen la población propiónica originaria en las leches<sup>10</sup> (ALAIS, 1985). También, AMIOT (1991), coincide en que es un tratamiento muy eficaz para la elaboración de productos de larga conservación, como leche en polvo, quesos de pasta cocida y quesos fundidos. El autor indica que se puede considerar que una leche al salir del bacterofugador contiene un 90% menos de gérmenes que a la entrada. En cuanto a esto, hay que considerar que en el proceso de elaboración del queso tipo Gouda realizado no se contempla un tratamiento de bacterofugación, lo que podría ayudar a reducir la carga propiónica inicial. Además podría deberse a un tratamiento térmico insuficiente, en cuanto a esto, Cosentino y Palmas (1997), citado por FUENTES (2003), sostienen que es necesaria una optimización de los parámetros del tratamiento térmico, con el fin de obtener alimentos con una alta calidad microbiológica.

---

<sup>10</sup> [http://www.uam.es/personal\\_pdi/ciencias/ssantoyo/fermentacion/trabajos/queso.pdf](http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/ssantoyo/fermentacion/trabajos/queso.pdf)

En el queso a la salida de prensa, ya es evidente el aumento en los recuentos de bacterias propiónicas, esto puede deberse a que se dan condiciones favorables para su desarrollo durante el proceso, por ejemplo condiciones óptimas de temperatura y pH, desde la premaduración de la leche (pH 6,5-6,8; T° 36±0,5 °C), hasta el dosificado y preensado de la cuajada en las columnas casomatic (pH 6,0-6,5; T° 36±0,5 °C). Nouveau (1981) citado por SORIA (1983), sostiene que la enzima lisozima, actúa contra las esporas y células vegetativas del género *Clostridium*, mejorando el curso de la fermentación propiónica. De acuerdo a esto, se podría presumir un probable efecto, cuando se está elaborando producto cuyo destino es un país que no permite la adición de nitrato de sodio, que es usado comúnmente en el proceso de elaboración, por lo cual se utiliza esta enzima.

Para el buen desarrollo de las bacterias propiónicas necesitan un pH óptimo entre 6,0 y 7,0, con un límite máximo de 8,5 y mínimo de 4,6. Valores críticos de pH se ubican alrededor de 5,0. Hay variaciones del orden de 0,1 a 0,2 unidades de pH que pueden determinar la continuación de la fermentación (Haverbeck y Jofré, (1980), citados por ASTORQUIZA, 1987). En la salida de prensa los valores de pH oscilan entre 5,2 – 5,6, acercándose más al valor crítico, pero no alcanzan valores por debajo de éste. Al salir de las prensas, los quesos son enfriados utilizando agua de la red, por aproximadamente 2 horas, con el objetivo de que entren a la salmuera a la misma temperatura que tiene ésta y además regular el pH. A la salida del saladero los quesos salen con un pH entre 5,1 – 5,5, por lo que no existe una gran variación de pH entre estas operaciones. Este comportamiento coincide con valores de pH descritos por SCOTT (1991), en quesos semiduros de cuajada lavada, los que van desde 6,5 en la leche con fermentos, hasta 5,15 después del salazonado.

HAYERBECK y JOFRE (1980), sostienen que un efecto combinado de pH y concentración de sal, en forma conjunta determinan la tasa de crecimiento de bacterias propiónicas. Así, a pH 7,0, la cantidad de NaCl necesaria para retardar la fermentación puede alcanzar al 6%, en tanto a pH 5,2, un 3% de NaCl puede transformarse en nivel crítico. Sin embargo, Robinson (1995) citado por URIBE (2002), reporta una concentración promedio de sal de 2% para el queso Gauda al final de su maduración.

No obstante, no se aprecian diferencias considerables en los recuentos del queso al salir de la salmuera. Si bien es cierto, hubo fechas en las que los recuentos disminuyeron en comparación a la salida de prensa, no existe diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0,05$ ).

A los 30 días de maduración, se obtuvo los recuentos más altos de bacterias propiónicas, lo cual puede responder, a la reactivación del crecimiento de las bacterias propiónicas a causa de los aminoácidos libres, liberados por enterococos o por la actividad proteolítica de algunas bacterias lácticas como *Lactobacillus lactis* (CHAPMAN, SHARPE, 1981).

Estudios realizados por NIKLITSCHKEK (1997) y FUENTES (2003), en queso Gauda, coinciden en valores de pH para el inicio y término de maduración, de 5,22 y 5,33 respectivamente.

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, citado por FUENTES, 2003).

Si bien, los recuentos aumentaron a los 30 días de maduración, no existe diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0,05$ ), con los quesos a la salida de prensa y saladero.

## V CONCLUSIONES

- Se comprueba la hipótesis de que los microorganismos causantes del defecto en el queso tipo Gauda, son bacterias pertenecientes a la familia de las *Propionibacterium*
- La leche recibida por la empresa durante el período evaluado presenta un contenido importante de bacterias propiónicas independiente de su origen y estadísticamente no hay diferencia significativa entre los recuentos y el origen.
- Los recuentos iniciales de bacterias propiónicas en la leche cruda disminuyen significativamente después del tratamiento térmico, sin embargo esta disminución es insuficiente para impedir su posterior desarrollo en el queso.
- Dentro de la línea de fabricación, el punto que presenta los mayores recuentos de bacterias propiónicas, es el queso a los 30 días de maduración, no obstante, no existen diferencias significativas entre éste punto y los puntos quesos a la salida de prensa y quesos a la salida del saladero.
- El concentrado proteico de leche cuando es usado en la estandarización de la materia prima no hace un aporte significativo de bacterias propiónicas, por lo que probablemente, no tiene mayor influencia en el producto final.
- La adquisición de una bacto-fugadora, para el pretratamiento de la leche, podría ser una alternativa de solución para disminuir la proliferación de bacterias propiónicas.

## VI RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo principal determinar la presencia de bacterias propiónicas en queso tipo Gauda, además de evaluar la carga de estas bacterias en la materia prima utilizada y durante la línea de elaboración, implementando una metodología analítica para el recuento de dichas bacterias.

Para lograr estos objetivos se tomaron muestras de leche cruda en el silo, leche pasteurizada en la caída de tina, queso a la salida de prensa, salida de saladero y con 30 días de maduración. Se muestreo además, concentrado proteico de leche utilizado en la estandarización. La leche utilizada en la elaboración se separó de acuerdo a su procedencia, disponiendo de leche recolectada en predios de la ciudad de Los Lagos, Temuco y Osorno. Se tomaron muestras en cinco fechas de elaboración diferentes, utilizando en dos fechas, concentrado proteico de leche, para cada una de las diferentes procedencias.

Se pudo comprobar la presencia de bacterias propiónicas en la materia prima, en los tres casos analizados, no obstante, la diferencia entre éstas, no es estadísticamente significativa al 95% de confianza, como para determinar cual aporta mayor carga bacteriana. Dentro de la línea de elaboración del queso tipo Gauda, el queso con 30 días de maduración arroja los mayores recuentos, seguido por el queso a la salida de prensa y saladero, presentando diferencias significativas, con respecto a la leche pasteurizada, en la cual disminuyen los recuentos, luego del tratamiento térmico. Sin embargo, no existe diferencia estadísticamente significativa, entre los quesos a partir de la salida de prensa. Las fechas de elaboración en las que se utilizó concentrado proteico de leche en la elaboración, no presentaron diferencias significativas, con respecto a las fechas donde no se incorporó.

## SUMMARY

The present work had as main objective to determine the presence of bacteria propiónicas in cheese type Gauda, besides evaluating the load of these bacteria in the used raw material and during the elaboration line, implementing an analytic methodology for the recount of these bacteria.

To achieve these objectives they took samples of raw milk in the silo, pasteurized milk in the tub fall, cheese to the press exit, brine exit and with 30 days of maturation. You sampling also, concentrated proteico of milk used in the standardization. The milk used in the elaboration separated according to its origin, having milk gathered in properties of the city of The Lakes, Temuco and Osorno. They took samples in five different elaboration dates, using in two dates, concentrated proteico of milk, for each one of the different origins.

It was possible to verify the presence of bacteria propiónicas in the raw material, in the three analyzed cases, nevertheless, the difference among these, is not statistically significant to 95% of trust, like to determine which contributes bigger bacterial load. Inside the line of elaboration of the cheese type Gauda, the cheese with 30 days of maturation throws the biggest recounts, continued by the cheese to the press exit and cheese to the brine exit, presenting significant differences, with regard to the pasteurized milk, in which diminish the recounts, after the thermal treatment. However, it doesn't exist differs statistically significant, among the cheeses, starting from the press exit. The elaboration dates in those that concentrated proteico of milk was used in the elaboration, didn't present significant differences, with regard to the dates where it didn't incorporate.

## VII BIBLIOGRAFÍA

ALAIS, CH. 1985. Ciencia de la Leche. Principios de Técnica Lechera 2ª ed. Barcelona. Reverté. 872 p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 1992. Standard methods for the examination of dairy products. Robert T. Marshall. 16<sup>th</sup> Ed. Washington, D.C. 546 p.

AMIOT, J. 1991. Ciencia y Tecnología de la Leche: principios y aplicaciones. Zaragoza. Acribia. 547 p.

ASTORQUIZA, E. 1987. Factibilidad de elaboración Industrial del queso producido en queserías de campo. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 97 p.

BERGEY, D. 2000. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. HOLT, J.; KRIEG, N.; SNEATH, P.; SHARPE, E.; BRYANT, M. y PFENNIG, N. (Eds.). Baltimore, London. Willians and Wilkins. 943 p.

BIOLOGÍA MOLECULAR. Leches fermentadas. s.f.  
<<http://209.85.165.104/search?q=cache:bq3eauXrsgsJ:ntextreme.galeon.com/uno.htm+bacterias+propi%C3%B3nicas+en+la+leche&hl=es&gl=cl&ct=clnk&cd=23>> (17/01/2007).

CARREÑO, E. 2004. Factores Determinantes de la Calidad Higiénica de la Leche de Pequeños Productores en tres Centros de Acopio de la Provincia de Valdivia. Tesis Lic. Ing. en Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 78 p.

CHILE. MINISTERIO DE SALUD. 2000. Reglamento Sanitario de los Alimentos. Diario Oficial de la Republica de Chile. 30 de julio de 2000. 102 p.

CHILE. INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. 1998. Norma Chilena, NCh 1011.1 Leche y productos lácteos – Muestreo – Parte 1: Leche cruda. Santiago. 5 p.

\_\_\_\_\_ 1980. Norma Chilena, NCh 1011.2 Leche y productos lácteos – Muestreo – Parte 2: Productos elaborados. Santiago. 5 p.

\_\_\_\_\_ 1999. Norma Chilena, NCh 2478. Productos lácteos – Queso Gauda – Requisitos. Santiago. 5 p.

\_\_\_\_\_ 1999. Norma Chilena, NCh 2065. Quesos con leche pasteurizada – Clasificación y requisitos generales. Santiago. 6 p.

CLASIFICACIÓN DE LOS QUESOS. s.f.

<<http://www.agroinformacion.com/leer-contenidos.aspx?articulo=525>>  
(18/01/2007).

CODEX ALIMENTARIUS. 2001. Leche y productos lácteos. Norma Internacional Individual del Codex para el queso Gouda. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias 2ª ed. FAO, Roma. Vol. 12. 130 p.

CORRALES, B.; HERNÁNDEZ, L.; NEREA, A. s.f. El Queso. Facultad de ciencias. Universidad Autónoma de Madrid.  
<[http://www.uam.es/personal\\_pdi/ciencias/ssantoyo/fermentacion/trabajos/queso.pdf](http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/ssantoyo/fermentacion/trabajos/queso.pdf)> (03/09/2006).

COSTE, E. s.f. Análisis Sensorial de Quesos. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias.

<<http://www.vet.unicen.edu.ar/Tecnologia/Jornadas/Conferencias/Conferencia%20Beatriz%20Coste.doc>> (19/01/2007).

DURAN, C. 1985. Contribución al estudio de tipificación del queso Paipa de Colombia. Tesis Magíster en Ciencias y Tecnología de la Leche. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Centro Tecnológico de la Leche para Chile y América Latina. 252 p.

FUENTES, L. 2003. Estudio de parámetros Microbiológicos que afectan la calidad del Queso tipo Gouda. Tesis Lic. Ing. en Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 92 p.

GAUNA, A. 2005. Elaboración de quesos de pasta semidura con ojos. Instituto Nacional de Tecnología Industrial. Argentina. 154 p.  
<<http://www.inti.gov.ar/lacteos/pdf/cuaderno.pdf>> (18/01/2007).

HAYERBECK, JC. y JOFRE, H. 1980. Cultivos lácteos empleados en la industria lechera y tecnología de algunos productos lácteos fermentados. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Centro Tecnológico de la Leche para Chile y América Latina. Valdivia. Chile. 123p.

HEESCHEN, W. 1998. Higiene y seguridad de la leche en los mercados europeos e internacionales. Industrias lácteas Españolas 229 (55):64.

HEIMLICH, W. y CARRILLO, B. 1995. Manual para Centros de Acopio de leche. Corporación de fomento de la producción (CORFO) - Universidad Austral de Chile. Egall- Master print. 166 p.

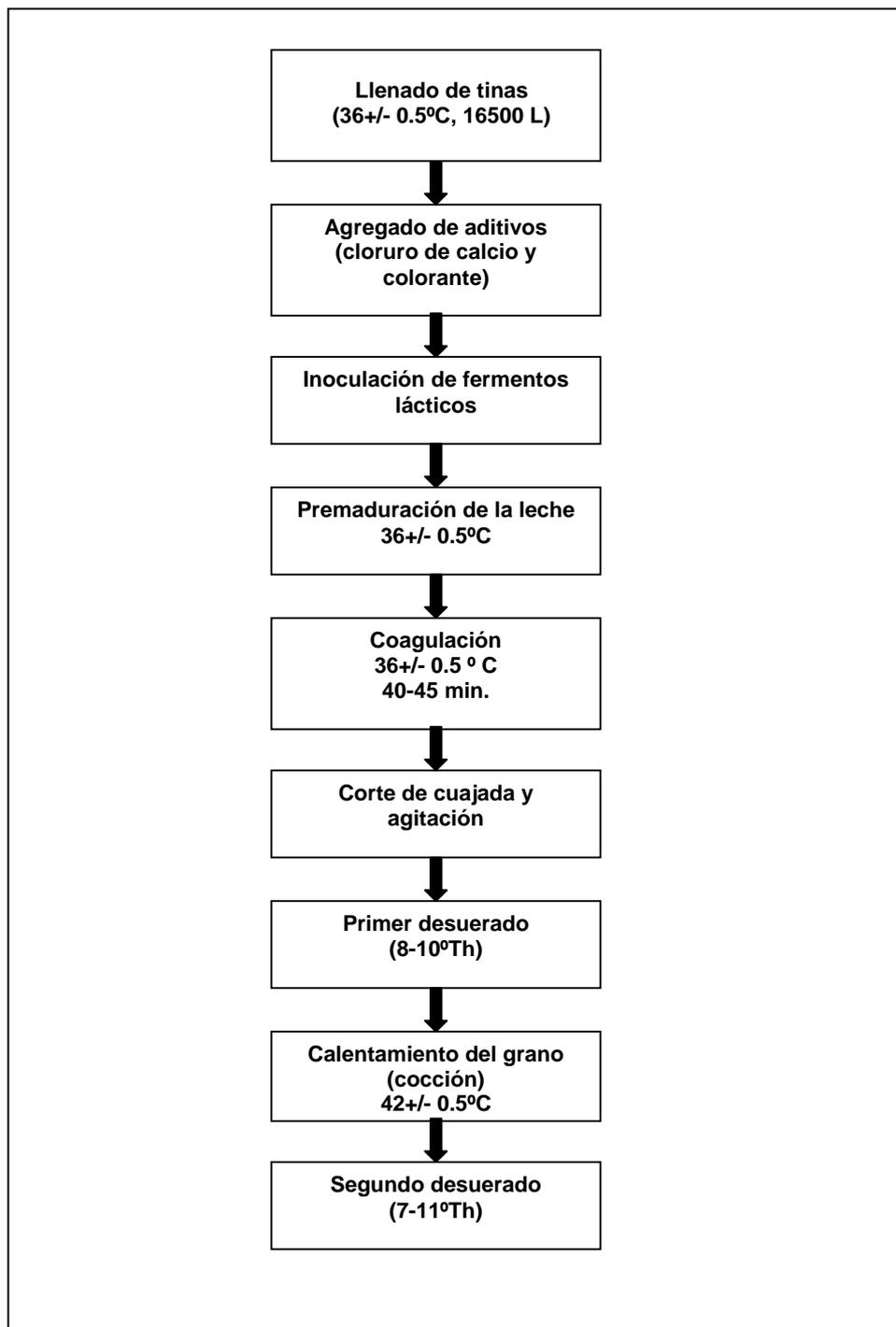
JAIME, L. 2004?. Principales Microorganismos utilizados en las Fermentaciones Alimentarias. Universidad Autónoma de Madrid.  
<[http://www.uam.es/personal\\_pdi/ciencias/ljaime/tema2fa.pdf](http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/ljaime/tema2fa.pdf)> (17/10/2006).

- JIMENEZ, V. 1989. La hinchazón precoz de los quesos. Industrias Lácteas Españolas 129: 21-22
- LOMELÍ, M.; TAMAYO, R. y ILARRAZA, A. s.f. Contaminación Biológica. Proyecto del CCH de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). <[http://209.85.165.104/search?q=cache:xF7\\_uKUxv1QJ:www.sagangea.org/hojared\\_biologica/paginas/contam%2520bacteriana%2520x%2520consumo%2520de%2520animales.htm+origen+bacterias+propio%2520B3nicas&hl=es&ct=clnk&cd=2&gl=cl](http://209.85.165.104/search?q=cache:xF7_uKUxv1QJ:www.sagangea.org/hojared_biologica/paginas/contam%2520bacteriana%2520x%2520consumo%2520de%2520animales.htm+origen+bacterias+propio%2520B3nicas&hl=es&ct=clnk&cd=2&gl=cl)> (16/01/2007).
- MADRID, A. 1990. Manual de Tecnología Quesera. Madrid, España. Mundi-Prensa. 336 p.
- MAGARIÑOS, H. 1980. Microbiología e higiene de la leche. Centro Tecnológico de la Leche para Chile y América Latina. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 124p.
- 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. Tesis Magister en Ciencia y Tecnología de la Leche. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 135 p.
- ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). 1981. Métodos de análisis microbiológicos. Manual correspondiente al módulo I. Equipo regional de fomento y capacitación en lechería de FAO para América Latina. Santiago. 18.1 p.
- \_\_\_\_\_1983. Tecnología y control de calidad de productos lácteos. Manual correspondiente al módulo I. Equipo regional de fomento y capacitación en lechería de FAO para América latina. Santiago. 5.66 p.

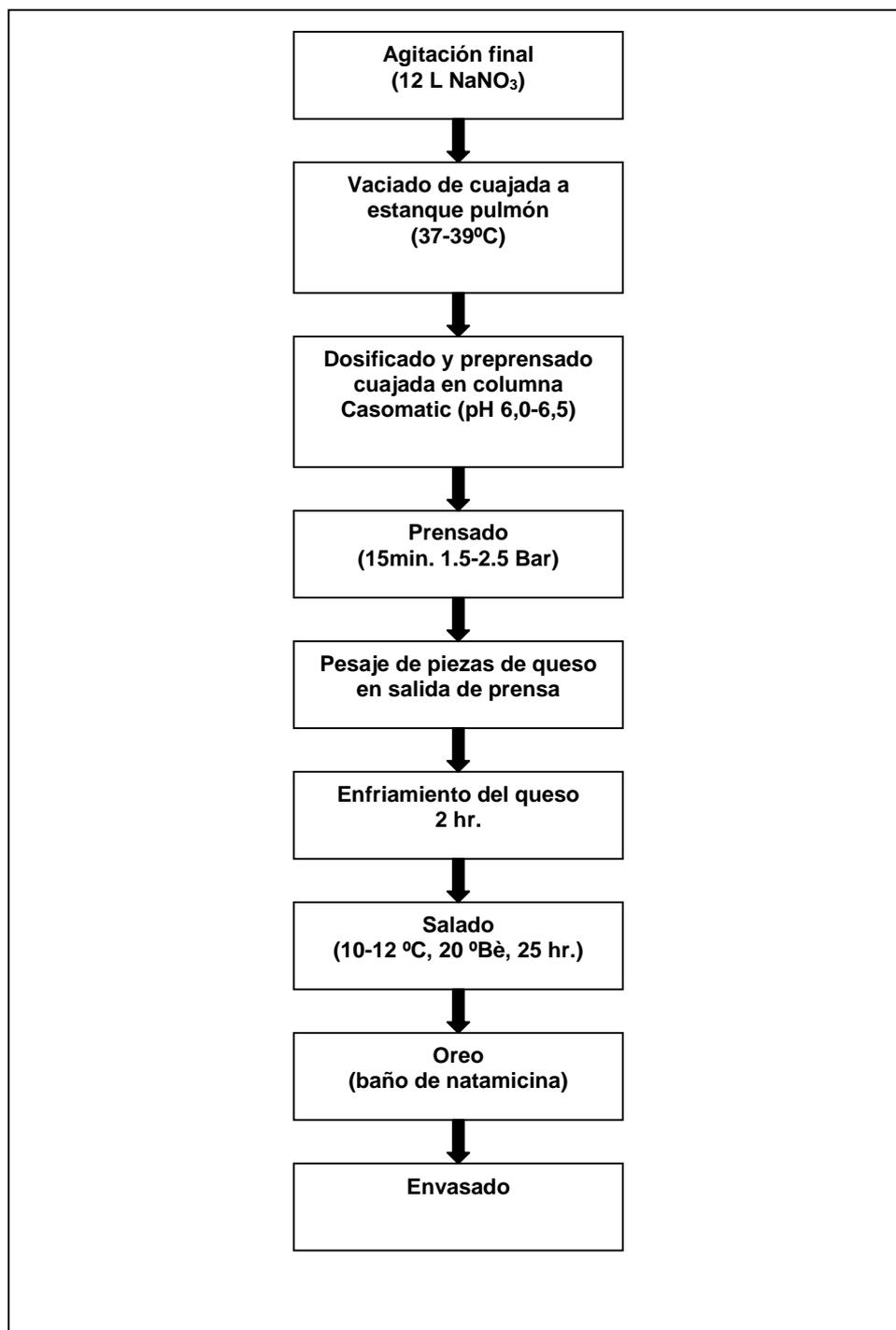
- PIZABARRO, A. 1995. Microbiología Industrial. Respiración y Fermentación. Genetics and Microbiology Research Group, Department of Agrarian Production. Public University of Navarre. Pamplona, Spain. <<http://209.85.165.104/search?q=cache:GZeL0fY38OkJ:www.unavarra.es/genmic/metabolismo/05respiracion%2520y%2520fermentacion.htm+fermentaci%C3%B3n+propio%C3%B3nica&hl=es&ct=clnk&cd=1&gl=cl>> (29/11/2006).
- SCOTT, R. 1991. Fabricación de queso. Zaragoza, España. Acribia. 520 p.
- SORDO, JC. 1983. Hinchazón de los quesos, causas y medios para combatirlos. Industrias Lácteas Españolas 51(33): 58-62
- SORIA, R, 1983. Contribución al Estudio de Hinchazón en el Queso Andino en dos Comunidades Rurales de la Región Interandina Central del Ecuador. Tesis Magíster en Ciencia y Tecnología de la Leche. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Centro Tecnológico de la Leche para Chile y América Latina. 118p.
- SUAREZ, J. y COLOMO, B. 1990. Control de esporulados butíricos. Industrias Lácteas Españolas. (141): 33 – 39.
- URIBE, M. 2002. Efecto del nitrato de sodio como aditivo en la elaboración de Queso tipo Gauda, sobre el contenido de bacterias Acido Butílicas. Tesis Lic. Ing. en Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 99p.
- <[http://www.queseriasdearaia.com/queso\\_idiazabal3.htm](http://www.queseriasdearaia.com/queso_idiazabal3.htm)> (18/01/2007).

## VIII ANEXOS

## ANEXO 1. Diagrama de flujo queso tipo Gauda



## Continuación ANEXO 1



**ANEXO 2****Diluciones usadas para cada tipo de muestra.**

<b>MUESTRA</b>	<b>DILUCIÓN</b>
Leche entera Los Lagos	-4 , -5
Leche entera Temuco	-4 , -5
Leche entera Osorno	-4 , -5
CPL	-2 , -3
Leche Caída de tina	-1 , -2
Queso Salida prensa	-5 , -6
Queso Salida saladero	-5 , -6
Queso 30 días de maduración	-5 , -6

## ANEXO 3

## Resultados primera etapa de muestreo

## 3.1 Recuentos de bacterias propiónicas en la materia prima

Fecha muestreo	Rcto. Bact. Propiónicas	PUNTOS DE MUESTREO		
		Leche entera Los Lagos	Leche entera Temuco	Leche entera Osorno
31-10-06	Ufc/ml	$3,8 \times 10^4$	$1,21 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$
	Log(ufc/ml)	4,58	5,08	5,49
13-11-06	Ufc/ml	-	-	$3,1 \times 10^5$
	Log(ufc/ml)	-	-	5,49
27-11-06	Ufc/ml	$2,51 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$	$3,1 \times 10^7$
	Log(ufc/ml)	5,40	4,60	7,49
<b>Promedio</b>		<b>144.500</b>	<b>80.500</b>	<b>10.540.000</b>
D. estándar		150.613	57.275	17.718.879
Coeficiente de variación (%)		104,23	71,15	168,11

## 3.1.1 Análisis estadísticos del recuento de bacterias propiónicas en la materia prima

- Análisis de varianza (ANDEVA)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2,66548	2	1,33274	1,71	0,2907
Within groups	3,11807	4	0,779517		
<b>Total (Corr.)</b>	<b>5,78354</b>	<b>6</b>			

De acuerdo al análisis de varianza, el valor P es mayor a 0.05, lo que indica con un nivel del 95% de confianza que no existe diferencia significativa entre los muestreos realizados con las distintas leches utilizadas como materia prima.

### 3.2 Recuentos de bacterias propiónicas en la secuencia de muestreo

Fecha muestreo	Rcto. Bact. Propiónicas	PUNTOS DE MUESTREO				
		Leche entera	Leche pasteurizada	Queso salida prensa	Queso salida saladero	Queso c/30 días
31-10-06	Ufc/ml	3,1x10 <sup>5</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>	3,1x10 <sup>4</sup>	3,1x10 <sup>4</sup>	1,51x10 <sup>7</sup>
	Log(ufc/ml)	5,49	3,15	4,49	4,49	7,18
13-11-06	Ufc/ml	1,2x10 <sup>5</sup>	6,0x10 <sup>3</sup>	3,1x10 <sup>7</sup>	-	1,9x10 <sup>7</sup>
	Log(ufc/ml)	5,08	3,78	7,49	-	7,28
27-11-06	Ufc/ml	3,1x10 <sup>5</sup>	6,1x10 <sup>3</sup>	2,52x10 <sup>7</sup>	9,4x10 <sup>6</sup>	182x10 <sup>7</sup>
	Log(ufc/ml)	5,49	3,79	7,40	6,97	7,24
<b>Promedio</b>		<b>246.667</b>	<b>4.500</b>	<b>18.743.667</b>	<b>4.715.500</b>	<b>17.433.333</b>
D. estándar		109.696	2.685	16.463.077	6.624.883	2.059.935
Coeficiente de variación (%)		44,47	59,67	87,83	140,49	11,82

#### 3.2.1 Análisis estadísticos del recuento de bacterias propiónicas en la secuencia de muestreo

- Análisis de varianza (ANDEVA)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	22,763	4	5,69074	5,51	0,0159
Within groups	9,28713	9	1,0319		
<b>Total (Corr.)</b>	<b>32,0501</b>	<b>13</b>			

De acuerdo al análisis de varianza, el valor P es menor a 0.05, lo que indica con un nivel del 95% de confianza que existe diferencia significativa entre los puntos de muestreo analizados.

- **Test de Rango Múltiple**

Method : 95,0 percent LSD

	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Homogeneous Groups</b>
Caída de tina	3	3,57333	X
Silo	3	5,35333	XX
S saladero	2	5,73	XX
S prensa	3	6,46	XX
Treinta días mad	3	7,24	X

<b>Contrast</b>	<b>Difference</b>	<b>+/- Limits</b>
Caída de tina - S prensa	*2,88667	1,87628
Caída de tina - S saladero	*2,15667	2,09775
Caída de tina - Silo	1,78	1,87628
Caída de tina - Treinta días mad	*3,66667	1,87628
S prensa - S saladero	0,73	2,09775
S prensa - Silo	1,10667	1,87628
S prensa - Treinta días mad	0,78	1,87628
S saladero - Silo	0,376667	2,09775
S saladero - Treinta días mad	1,51	2,09775
Silo - Treinta días mad	*1,88667	1,87628

\* 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 3 grupos homogéneos, usando una columna de X.

## ANEXO 4

## Leche entera de Los Lagos

## 4.1 Resultados recuentos de bacterias propiónicas en muestreos con leche entera de Los Lagos.

Fecha muestreo	Rcto. Bact. Propiónicas	PUNTOS DE MUESTREO				
		Leche entera	Leche pasteurizada	Queso salida prensa	Queso salida saladero	Queso c/30 días
10-12-06	Ufc/ml	1,69x10 <sup>6</sup>	3,7x10 <sup>3</sup>	2,5x10 <sup>7</sup>	4,4x10 <sup>7</sup>	3,1x10 <sup>7</sup>
	Log(ufc/ml)	6,23	3,57	7,40	7,64	7,49
11-12-06	Ufc/ml	3,0x10 <sup>6</sup>	2,0x10 <sup>3</sup>	2,3x10 <sup>7</sup>	2,2x10 <sup>7</sup>	6,4x10 <sup>7</sup>
	Log(ufc/ml)	6,48	3,30	7,36	7,34	7,81
12-12-06	Ufc/ml	2,9x10 <sup>5</sup>	4,2x10 <sup>3</sup>	3,5x10 <sup>7</sup>	2,6x10 <sup>7</sup>	5,0x10 <sup>7</sup>
	Log(ufc/ml)	5,46	3,62	7,54	7,41	7,70
14-12-06	Ufc/ml	1,35x10 <sup>6</sup>	1,2x10 <sup>3</sup>	3,4x10 <sup>7</sup>	1,8x10 <sup>7</sup>	6,9x10 <sup>7</sup>
	Log(ufc/ml)	6,13	3,08	7,53	7,26	7,84
15-12-06	Ufc/ml	8,0x10 <sup>4</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	2,1x10 <sup>7</sup>	1,6x10 <sup>7</sup>	1,3x10 <sup>7</sup>
	Log(ufc/ml)	4,90	3,00	7,32	7,20	7,11
<b>Promedio</b>		<b>1.282.000</b>	<b>2.420</b>	<b>27.600.000</b>	<b>25.200.000</b>	<b>45.400.000</b>
D. estándar		1.178.078	1.456	6.465.291	11.189.280	23.351.659
Coeficiente de variación (%)		91,89	60,19	23,42	44,40	51,44

#### 4.2 Análisis estadísticos de los resultados con leche entera de Los Lagos

- Leche cruda y pasteurizada

##### Análisis de varianza (ANDEVA)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	15,9517	1	15,9517	64,24	0,0000
Within groups	1,98652	8	0,248315		
<b>Total (Corr.)</b>	<b>17,9382</b>	<b>9</b>			

De acuerdo al análisis de varianza, el valor P es menor a 0.05, lo que indica con un nivel del 95% de confianza que existe diferencia significativa entre la leche antes y después del tratamiento.

- Queso a la salida de prensa, salida de saladero y con 30 días de maduración

##### Análisis de varianza (ANDEVA)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,129333	2	0,0646667	1,49	0,2636
Within groups	0,5198	12	0,0433167		
<b>Total (Corr.)</b>	<b>0,649133</b>	<b>14</b>			

De acuerdo al análisis de varianza, el valor P es mayor a 0.05, lo que indica con un nivel del 95% de confianza que no existe diferencia significativa entre los quesos analizados.

- **Secuencia de muestreo**

#### **Análisis de varianza (ANDEVA)**

<b>Source</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>Df</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>P-Value</b>
<b>Between groups</b>	1,07054	4	0,267636	0,08	0,9878
<b>Within groups</b>	67,5023	20	3,37512		
<b>Total (Corr.)</b>	68,5729	24			

De acuerdo al análisis de varianza, el valor P es mayor a 0.05, lo que indica con un nivel del 95% de confianza que no existe diferencia significativa entre las fechas de muestreo analizadas.

## ANEXO 5

## Leche entera de Temuco

## 5.1 Resultados recuento de bacterias propiónicas en muestreos con leche entera de Temuco.

Fecha muestreo	Rcto. Bact. Propiónicas	PUNTOS DE MUESTREO				
		Leche entera	Leche pasteurizada	Queso salida prensa	Queso salida saladero	Queso c/30 días
13-12-06	Ufc/ml	2,05x10 <sup>6</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>	2,4x10 <sup>7</sup>	3,1x10 <sup>7</sup>	1,8x10 <sup>7</sup>
	Log(ufc/ml)	6,31	3,15	7,38	7,49	7,26
27-12-06	Ufc/ml	1,5x10 <sup>6</sup>	1,2x10 <sup>3</sup>	7,0x10 <sup>6</sup>	2,0x10 <sup>7</sup>	6,9x10 <sup>7</sup>
	Log(ufc/ml)	6,18	3,08	6,85	7,30	7,84
28-12-06	Ufc/ml	1,7x10 <sup>6</sup>	2,1x10 <sup>3</sup>	1,2x10 <sup>7</sup>	1,9x10 <sup>7</sup>	3,4x10 <sup>7</sup>
	Log(ufc/ml)	6,23	3,32	7,08	7,28	7,53
09-01-07	Ufc/ml	1,3x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>3</sup>	3,3x10 <sup>7</sup>	4,6x10 <sup>7</sup>	4,5x10 <sup>7</sup>
	Log(ufc/ml)	6,11	3,04	7,52	7,66	7,65
10-01-07	Ufc/ml	3,0x10 <sup>5</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	1,7x10 <sup>7</sup>	3,0x10 <sup>7</sup>	7,6x10 <sup>7</sup>
	Log(ufc/ml)	5,48	3,00	7,23	7,48	7,88
<b>Promedio</b>		<b>1.370.000</b>	<b>1.360</b>	<b>18.600.000</b>	<b>29.200.000</b>	<b>48.400.000</b>
D. estándar		659.166	439	10.212.737	10.894.952	24.130.893
Coeficiente de variación (%)		48,11	32,30	54,91	37,31	49,86

## 5.2 Análisis estadísticos de los resultados con leche entera de Temuco

- Leche cruda y pasteurizada

### Análisis de varianza (ANDEVA)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	21,6678	1	21,6678	341,25	0,0000
Within groups	0,50796	8	0,063495		
<b>Total (Corr.)</b>	<b>22,1758</b>	<b>9</b>			

De acuerdo al análisis de varianza, el valor P es menor a 0.05, lo que indica con un nivel del 95% de confianza que existe diferencia significativa entre la leche antes y después del tratamiento.

- Queso a la salida de prensa, salida de saladero y con 30 días de maduración

### Análisis de varianza (ANDEVA)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,442333	2	0,221167	4,26	0,0401
Within groups	0,62344	12	0,0519533		
<b>Total (Corr.)</b>	<b>0,06577</b>	<b>14</b>			

De acuerdo al análisis de varianza, el valor P es menor a 0.05, lo que indica con un nivel del 95% de confianza que existe diferencia significativa entre los quesos analizados.

### Test de Rango Múltiple

Method : 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
S prensa	5	7,212	X
S saladero	5	7,442	XX
Treinta días mad	5	7,632	X

Contrast	Difference	+/- Limits
S prensa - S saladero	- 0,23	0,314093
S prensa - Treinta días mad	*- 0,42	0,314093
S saladero - Treinta días mad	- 0,19	0,314093

\* 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.

- **Secuencia de muestreo**

### Análisis de varianza (ANDEVA)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,096744	4	0,024186	0,01	0,9999
Within groups	71,493	20	3,57465		
<b>Total (Corr.)</b>	<b>71,5897</b>	<b>24</b>			

De acuerdo al análisis de varianza, el valor P es mayor a 0.05, lo que indica con un nivel del 95% de confianza que no existe diferencia significativa entre las fechas de muestreo analizadas.

## ANEXO 6

## Leche entera de Osorno

## 6.1 Resultados recuentos de bacterias propiónicas en muestreos con leche entera de Osorno.

Fecha muestreo	Rcto. Bact. Propiónicas	PUNTOS DE MUESTREO				
		Leche entera	Leche pasterizada	Queso salida prensa	Queso salida saladero	Queso c/30 días
24-01-07	Ufc/ml	5,0x10 <sup>5</sup>	1,2x10 <sup>3</sup>	3,6x10 <sup>7</sup>	5,1x10 <sup>7</sup>	6,3x10 <sup>7</sup>
	Log(ufc/ml)	5,70	1,08	7,56	7,71	7,80
25-01-07	Ufc/ml	1,8x10 <sup>6</sup>	5,2x10 <sup>3</sup>	1,8x10 <sup>7</sup>	1,2x10 <sup>7</sup>	1,2x10 <sup>7</sup>
	Log(ufc/ml)	6,26	3,72	7,26	7,08	7,08
30-01-07	Ufc/ml	5,0x10 <sup>5</sup>	1,6x10 <sup>3</sup>	8,0x10 <sup>7</sup>	3,4x10 <sup>7</sup>	6,3x10 <sup>7</sup>
	Log(ufc/ml)	5,70	3,20	7,90	7,53	7,80
01-02-07	Ufc/ml	4,1x10 <sup>6</sup>	2,0x10 <sup>3</sup>	1,1x10 <sup>7</sup>	1,3x10 <sup>7</sup>	8,2x10 <sup>7</sup>
	Log(ufc/ml)	6,61	3,30	7,04	7,11	7,91
06-02-07	Ufc/ml	1,0x10 <sup>6</sup>	1,2x10 <sup>4</sup>	1,8x10 <sup>7</sup>	5,4x10 <sup>7</sup>	7,1x10 <sup>7</sup>
	Log(ufc/ml)	6,00	4,08	7,26	7,73	7,85
<b>Promedio</b>		<b>1.580.000</b>	<b>4.400</b>	<b>32.600.000</b>	<b>32.800.000</b>	<b>58.200.000</b>
D. estándar		1.505.656	4.534	28.067.775	20.042.454	26.975.915
Coeficiente de variación (%)		95,29	103,05	86,10	61,11	46,35

## 6.2 Análisis estadísticos de los resultados con leche entera de Osorno

- Leche cruda y pasteurizada

### Análisis de varianza (ANDEVA)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	16,6152	1	16,6152	102,77	0,0000
Within groups	1,29344	8	0,16168		
<b>Total (Corr.)</b>	<b>17,9086</b>	<b>9</b>			

De acuerdo al análisis de varianza, el valor P es menor a 0.05, lo que indica con un nivel del 95% de confianza que existe diferencia significativa entre la leche antes y después del tratamiento.

- Queso a la salida de prensa, salida de saladero y con 30 días de maduración

### Análisis de varianza (ANDEVA)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,24496	2	0,12248	1,12	0,3596
Within groups	1,31788	12	0,109823		
<b>Total (Corr.)</b>	<b>1,56284</b>	<b>14</b>			

De acuerdo al análisis de varianza, el valor P es mayor a 0.05, lo que indica con un nivel del 95% de confianza que no existe diferencia significativa entre los quesos analizados.

- **Secuencia de muestreo**

**Análisis de varianza (ANDEVA)**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
<b>Between groups</b>	0,246424	4	0,061606	0,02	0,9992
<b>Within groups</b>	64,3694	20	3,21847		
<b>Total (Corr.)</b>	64,6158	24			

De acuerdo al análisis de varianza, el valor P es mayor a 0.05, lo que indica con un nivel del 95% de confianza que no existe diferencia significativa entre las fechas de muestreo analizadas.

## ANEXO 7

## Resultados recuento de bacterias propiónicas en concentrado proteico de leche

Fecha de muestreo	Recuento de bacterias propiónicas	
	ufc/ml	Log ufc/ml
<b>13-12-06</b>	8,40x10 <sup>3</sup>	4,92
<b>15-12-06</b>	7,70x10 <sup>3</sup>	4,89
<b>28-12-06</b>	5,00x10 <sup>3</sup>	4,70
<b>29-12-06</b>	5,20x10 <sup>3</sup>	4,72
<b>11-01-07</b>	1,15x10 <sup>5</sup>	5,06
<b>25-01-07</b>	3,80 x10 <sup>3</sup>	4,58
<b>01-02-07</b>	3,80 x10 <sup>3</sup>	4,58
Promedio	64.857	4,81
D. estándar	28.451	0,18
Coeficiente de variación (%)	43,86	3,81

## ANEXO 8

## Comparación entre diferentes leche utilizadas

## 8.1 Promedios del recuento de bacterias propiónicas con las distintas leches analizadas

Materia prima analizada	Promedio Rcto. Bact. Propiónicas	PUNTOS DE MUESTREO				
		Leche entera	Leche pasteurizada	Queso salida prensa	Queso salida saladero	Queso c/30 días
Los Lagos	Ufc/ml	1,28x10 <sup>6</sup>	2,42x10 <sup>3</sup>	2,76x10 <sup>7</sup>	2,52x10 <sup>7</sup>	4,54x10 <sup>7</sup>
	Log(ufc/ml)	6,11	3,38	7,44	7,40	7,66
Temuco	Ufc/ml	1,37x10 <sup>6</sup>	1,36x10 <sup>3</sup>	1,86x10 <sup>7</sup>	2,92x10 <sup>7</sup>	4,84x10 <sup>7</sup>
	Log(ufc/ml)	6,14	3,13	7,27	7,47	7,68
Osorno	Ufc/ml	158x10 <sup>5</sup>	4,4x10 <sup>3</sup>	3,26x10 <sup>7</sup>	3,28x10 <sup>7</sup>	582x10 <sup>7</sup>
	Log(ufc/ml)	6,20	3,64	7,51	7,52	7,76

## 8.2 Análisis estadísticos de los promedios de las distintas leches

- Análisis de varianza (ANDEVA)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,0922133	2	0,0461067	0,01	0,9860
Within groups	39,0625	12	3,25579		
Total (Corr.)	39,1617	14			

De acuerdo al análisis de varianza, el valor P es mayor a 0.05, lo que indica con un nivel del 95% de confianza que no existe diferencia significativa entre las leches analizadas.

**ANEXO 9****Quesos con 30 días de maduración****9.1 Imágenes de quesos con 30 días de maduración, elaborados con leche proveniente de Los Lagos**

10 / 12 / 2006	11 / 12 / 2006
	
12 / 12 / 2006	14 / 12 2006
	
15 / 12 / 2006	
	

**9.2 Imágenes de quesos con 30 días de maduración, elaborados con leche proveniente de Temuco**

<b>13/ 12 / 2006</b>	<b>27/ 12 / 2006</b>
	
<b>28 12 / 2006</b>	<b>09 / 01 / 2007</b>
	
<b>10/ 01 / 2007</b>	
	

**9.3 Imágenes de quesos con 30 días de maduración, elaborados con leche proveniente de Osorno**

<b>24 / 01 / 2007</b>	<b>25 / 01 / 2007</b>
 A rectangular slice of pale yellow cheese with a smooth, slightly moist surface. There are a few small, dark brown spots scattered across the surface.	 A rectangular slice of pale yellow cheese, similar to the previous one, but with more pronounced dark brown spots and a slightly more textured surface.
<b>30/ 01 / 2007</b>	<b>01/ 02 / 2007</b>
 A rectangular slice of pale yellow cheese. The surface is more textured and shows several dark brown spots, indicating further ripening.	 A rectangular slice of pale yellow cheese. The surface is very textured and shows many dark brown spots, indicating significant ripening.
<b>06/ 02 / 2007</b>	
 A rectangular slice of pale yellow cheese. The surface is very textured and shows many dark brown spots, indicating significant ripening.	