



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

OFICINA DE PARTES - FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	23 MAR 2007
Hora	15:17
Nº Ingreso	1332



INFORME FINAL TÉCNICO Y DE DIFUSIÓN

NOMBRE DEL PROYECTO:

MEJORAMIENTO DE LA CALIDAD Y DIFERENCIACIÓN DE QUESOS DE CABRA ELABORADOS CON LECHE PASTEURIZADA MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE FERMENTOS LÁCTICOS LOCALES SELECCIONADOS.

CÓDIGO: FIA-PI-C-2004-I - P - 040

REGION(ES) DE EJECUCIÓN: Metropolitana y IV

FECHA DE APROBACIÓN: 27 de diciembre de 2007

AGENTE EJECUTOR

- Nombre : Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA)
Universidad de Chile
- RUT : 60.910.000-1
- Dirección : El Líbano 5524, Macul
- Región : Metropolitana
- Fono : 6781401
- Fax : 2214030
- E-mail : gfiguero@uchile.cl
- Web : www.inta.cl

AGENTES ASOCIADOS

- Nombre : Universidad Tecnológica Metropolitana
- RUT : 70.729.100-1
- Dirección : Dieciocho 161
- Región : Metropolitana
- Fono : 7877123
- Fax : 6981311
- E-mail : rectoria.casacentral@utem.cl
- Web : www.utem.cl



- Nombre : Instituto Nacional de Promoción Agraria (INPROA)
- RUT : 70.723.100-1
- Dirección : Federico Froebel 1676
- Región : Metropolitana
- Fono : 2252720
- Fax : 2050318
- E-mail : r.michea@inproa.cl
- Web : www.inproa.cl

COORDINADOR DEL PROYECTO: Guillermo Figueroa

COSTO TOTAL DEL PROYECTO: \$114.495.851

FINANCIAMIENTO SOLICITADO A FIA: \$69.006.726 (60%)

PERIODO DE EJECUCIÓN:

FECHA DE INICIO

(dd/mm/aaaa):

01-01-2005

FECHA DE TÉRMINO

(dd/mm/aaaa):

23-01-2007

DURACIÓN (meses)

24 meses

Marzo 2007



RESUMEN EJECUTIVO

El objetivo general de este proyecto fue incrementar la calidad organoléptica y especificidad de los quesos producidos por los pequeños productores de la IV Región mediante el empleo de fermentos lácticos locales que puedan reincorporarse a la leche pasteurizada. Dichos fermentos deberán conferir a los quesos cualidades organolépticas deseables y cumplir con los requisitos sanitarios.

El presente proyecto implicó la realización de 3 fases. La primera fue obtener y seleccionar cepas lácticas de leche y queso de cabra que tuviesen propiedades tecnológicas específicas, posteriormente se elaboró quesos en base a fermentos seleccionados y determinar la mejor combinación de cepas según las propiedades descritas y los análisis organolépticos a los que fueron sometidos los quesos elaborados. Además, se efectuaron capacitaciones en Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) e higiene de alimentos.

A partir de muestras obtenidas de diferentes etapas de la elaboración de queso de cabra artesanal se aisló, en medios de cultivos específicos, bacterias ácido lácticas que luego fueron identificadas fenotípicamente. De las mismas, se seleccionaron cepas con propiedades tecnológicas en base a la capacidad de producir diacetilo; exopolisacáridos, actividad lipolítica y acidificante. El perfil general de la evolución de la flora láctica durante el proceso de fabricación del queso se realizó mediante PCR y Geles de Electroforesis en Gradiente de Temperatura (TTGE). El DNA bacteriano de dichas muestras se extrajo usando un bead-beater (Biospec) y luego se amplificó con partidores universales o específicos (uno de ellos con un clamp GC) que amplifican la región entre V2 y V3 del rDNA 16S de eubacterias.

Los resultados obtenidos pueden resumirse en dos áreas:

A nivel de productores. Se realizó capacitaciones en Buenas Prácticas Agrícolas y de Manufactura, enfocadas específicamente a temas de higiene y peligros biológicos en alimentos, a 18 productores participantes del estudio y otros 8 productores artesanales de la región. Luego se diseñó y aplicó una encuesta de cumplimiento de buenas prácticas, actividad no contemplada en el proyecto original, la cual permitió definir los temas prioritarios para la realización del segundo curso de capacitación.

A nivel de laboratorio. Las actividades estuvieron enfocadas a aislar y caracterizar las propiedades tecnológicas de las bacterias lácticas provenientes de muestras de quesos de cabra artesanal. Se aisló 507 cepas de bacterias lácticas, de las cuales 129 presentan actividad lipolítica, 247 son productoras de diacetilo y 101 de exopolisacáridos. Además se evaluó actividad acidificante y antagonica frente a 3 patógenos alimentarios. En base a los resultados obtenidos se diseñó, estandarizó y elaboró 6 mezclas de fermentos lácticos para producir queso de cabra a nivel piloto en una planta seleccionada. Posteriormente se determinó la inocuidad microbiológica de los quesos experimentales y controles al término del periodo de maduración de 30 días. Estos quesos, fueron luego evaluados por un panel de evaluación sensorial para determinar y cuantificar sus cualidades organolépticas, textura y apariencia. Las cepas de los fermentos correspondientes a los tres quesos

mejor evaluados (M1, M3 y M5) fueron identificadas fenotípicamente a nivel de especie bacteriana, se determinó su susceptibilidad a los antibióticos y presencia de plasmidios. En base a estos resultados se dispone de 3 fermentos que pueden ser usados en la elaboración de que queso de cabra a partir de leche pasteurizada, cuyo patentamiento esta en tramite.

TEXTO PRINCIPAL

1. Cumplimiento de los objetivos del proyecto

Objetivo general del proyecto: “Mejorar la calidad organoléptica y la especificidad del queso de cabra elaborado con leche pasteurizada por queserías de la IV región, mediante la utilización de fermentos lácticos locales previamente caracterizados y seleccionados a partir de quesos artesanales fabricados con leche cruda”.

Este objetivo se cumplió en un 100%, mediante la obtención de dos quesos de cabra elaborados con fermentos lácticos locales. Estos quesos fueron seleccionados a partir de un panel de evaluación sensorial capacitado y resultaron con características similares a los quesos artesanales elaborados a partir de leche cruda (no presentaron diferencias significativas). Estos fermentos se encuentran en etapa de estudio de factibilidad de patentamiento por parte de la Universidad de Chile, para posteriormente acceder a recursos que permitan su patentamiento conjunto con FIA.

Objetivos Específicos

1.1. Aislar, caracterizar y conservar las bacterias lácticas presentes en las diferentes etapas de elaboración de queso de cabra artesanal. 100%

En el proyecto original se propuso trabajar con 5 productores, de los cuales se obtendrían 5 muestras de leche, 5 de queso de 15 días y 5 de quesos de 30 días de maduración, con un total de 45 muestras a analizar. Sin embargo, con el fin de aumentar la biodiversidad de las cepas y debido al gran interés de los productores por participar, se estimó adecuado aumentar el número de productores participantes a 18 (permanentes) y 8 (momentáneos), incluyendo muestras de productores del valle y cordilleranos, con lo que se logró una mayor representatividad de la flora láctica de la región. Esto se tradujo en un incremento del número total de muestras a 100 (Tabla 1), con un incremento del 220% respecto de la propuesta original.

Tabla 1. Detalle de muestreo

ITEM	N
Nº de productores	26
Nº total de muestras recibidas:	100
Nº total muestras procesadas	100
Leche	29
Queso 15*	30
Queso 30*	33
Suero	8

*Incluye quesos de cordillera (n: 20)



A la totalidad de las muestras obtenidas (100), se les efectuó un control de calidad microbiológica mediante la determinación de la presencia de microorganismos indicadores y patógenos según lo especificado en el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA).

Luego se procedió al aislamiento y cuantificación de las bacterias lácticas (*Lactobacillus* termófilos y mesófilos, *Streptococcus* spp., *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus* spp.), las que posteriormente fueron identificadas fenotípicamente a través de tinción de Gram, características culturales y pruebas bioquímicas.

- 1.2. Seleccionar las cepas lácticas con propiedades tecnológicamente relevantes respecto a actividades acidificante, lipolítica y antibacteriana, y a la producción de exopolisacárido y diacetilo. 100%

La totalidad de las cepas lácticas aisladas fueron sometidas a pruebas tecnológicas relevantes a la producción de queso. Luego de las pruebas tecnológicas, se estableció un ranking de las cepas lácticas según las propiedades señaladas y se seleccionaron 10 cepas. Estas cepas fueron utilizadas, en diferentes proporciones, para la obtención de 6 fermentos para la elaboración de quesos en la planta piloto seleccionada.

- 1.3. Elaborar quesos experimentales en una quesería utilizando distintas mezclas de fermentos lácticos locales seleccionados en base a sus propiedades tecnológicas. 100%

Para la primera etapa de elaboración de los quesos, se utilizó una planta piloto que reuniera las condiciones de higiene y producción pasteurizada requeridas por el proyecto (planta lechera "Las Majadas"). En ésta se elaboraron 6 quesos experimentales (con las cepas seleccionadas) y un control que serviría como parámetro de comparación en la etapa de análisis organoléptico. Una vez finalizada la producción, los quesos fueron sometidos a una etapa de maduración por 30 días, para luego ser trasladados al Laboratorio de Microbiología del INTA y la UTEM para su análisis microbiológico y posteriormente el organoléptico.

- 1.4. Seleccionar la mejor mezcla de fermentos mediante evaluación de la calidad organoléptica de los productos obtenidos. 100%

Esta etapa se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis Sensorial del INTA. La evaluación de calidad se realizó mediante un panel de 12 jueces entrenados y los parámetros medidos fueron: apariencia, aroma, sabor y textura. Los resultados de este análisis permitieron seleccionar dos fermentos que serían utilizados en la etapa posterior.



1.5. Elaborar quesos a partir de leche pasteurizada utilizando la mezcla de fermentos seleccionada, en las queserías participantes en el estudio. 100%

Una vez seleccionados los fermentos definitivos, éstos fueron enviados a 4 queserías seleccionadas para elaborar quesos con leche pasteurizada. Una vez elaborados, los quesos fueron sometidos a 30 días de maduración, para luego ser trasladados al Laboratorio de Microbiología del INTA para realizar análisis microbiológico y, una vez aprobado éste, organoléptico.

1.6. Capacitar al personal de las queserías en buenas prácticas y uso de los fermentos lácticos locales en la elaboración de quesos de cabra artesanales. 100%

Durante el desarrollo del proyecto se efectuaron tres capacitaciones en BPA, higiene y peligros microbiológicos, que permitieron que algunos productores más aventajados pudiesen implementar medidas de higiene que les permitieran obtener quesos de mayor calidad e inocuidad. Esta realidad no se cumplió en todos los casos, ya que los productores de menor tamaño no pudieron aplicar los conceptos entregados y en otros casos, como el de los productores trashumantes, prácticamente no existe posibilidad de asegurar la inocuidad. Éste es un aspecto que requiere de especial cuidado y trabajo continuo, ya que el nivel de capacitación de estos productores es muy bajo.

1.7. Evaluar comparativamente la producción de quesos de cabra en base al fermento seleccionado y un fermento comercial disponible. 100%

En el marco del proyecto se decidió que la mejor forma de evaluar la calidad organoléptica de los quesos era a través de un nuevo panel de evaluación sensorial. Para esto se utilizó el mismo sistema descrito en el objetivo 4 y además se entregaron muestras de quesos a FIA para que fueran evaluados por un panel de expertos (voluntarios). Los resultados, que coincidieron en ambos paneles, permitieron seleccionar un fermento como resultado final del proyecto.

1.8. Gestionar contactos con empresas que posean tecnología o la intención de producir en forma comercial los fermentos desarrollados en el presente proyecto. 100%

En Chile no existen empresas dedicadas a la elaboración y producción de fermentos lácticos y la totalidad de los fermentos utilizados en las queserías del país son importados (principalmente desde Francia). Por este motivo, la mejor opción para la continuidad y aprovechamiento de los resultados del estudio, es mediante la inversión en una planta piloto que permita el desarrollo de los fermentos a escala semi-industrial y su disponibilidad para los productores. Para esto, la planta debe ubicarse en la IV Región (La Serena u Ovalle), donde se encuentra la mayor parte de los productores de queso de cabra del país.

2. Aspectos metodológicos

Descripción de la metodología efectivamente utilizada

Las metodologías aplicadas en la ejecución del presente proyecto correspondieron a las propuestas en el proyecto original exceptuando algunas modificaciones. Ellas fueron:

2.1. Control de calidad microbiológica de las muestras

En la totalidad de las muestras recolectadas (100) se determinó la presencia de microorganismos indicadores y patógenos según lo especificado en el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA). Esto incluyó el recuento de Enterobacterias y de *S. aureus*, y la detección de *Salmonella*, mediante medios selectivos, diferenciales. La confirmación se realizó por pruebas bioquímicas y en acuerdo con la metodología especificada en el Manual de Análisis Bacteriológico de la FDA, 8ª Ed. (BAM-8). Los microorganismos obtenidos en este análisis fueron almacenados en un cepario para ser usados posteriormente en los ensayos de actividad antibacteriana.

2.2. Aislamiento cuantificación de bacterias lácticas

A partir de las 100 muestras obtenidas, se usó sistemas de aislamiento en cultivo para los siguientes Géneros bacterianos: *Lactobacillus* termófilos y mesófilos, *Streptococcus spp.*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus spp.* Los recuentos para esos mismos microorganismos fueron realizados mediante dilución seriada de las muestras y siembra en medios selectivos propuestos en el proyecto. Todas las cepas aisladas (n= 507) fueron mantenidas y almacenadas en medio leche descremada al 10% a -20°C, para posteriormente caracterizar sus propiedades tecnológicas.

2.3. Identificación fenotípica de las bacterias lácticas

La identificación fenotípica de las cepas aisladas, se realizó en base a tinción de Gram, características culturales y pruebas bioquímicas. Debido al aumento en el número de muestras, la identificación de especie con el sistema API CH 50, solo se realizó en aquellas cepas con propiedades tecnológicas relevantes y que fueron seleccionadas como fermentos locales.

2.4. Evaluación de cepas lácticas con propiedades tecnológicas

Inicialmente, la selección de cepas con propiedades tecnológicas de cada uno de los géneros bacterianos propuestos en el proyecto, se inició con una fase de screening de las 507 cepas aisladas, a las que se determinó las siguientes propiedades:

Actividad lipolítica: En una primera etapa, de acuerdo al Género bacteriano se evaluaron diferentes sustratos y medios de cultivo utilizando el test de difusión en agar (Otertholm et al.). Entre éstos se incluyó sustratos grasos tales como crema de leche, mantequilla, aceite de oliva, Tween 20, Tween 80 y tributirina, con o sin los indicadores Water blue, Spirit blue y Rhodamine B. En todos los ensayos se incorporó cepas de referencia como *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 25923. Los que permitieron mejor lectura y resultaron más sensibles para el caso de *Lactobacillus* mesófilos y termófilos fueron el agar MRS con tributirina al 1% o con Tween 20 al 0,4%. En el caso de *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* se utilizó agar M17 con crema de leche al 1% y simultáneamente agar M17 con crema al 1% y Rhodamine B al 0,01%. La adición de este indicador permitió destacar el halo alrededor del crecimiento bacteriano



produciendo fluorescencia bajo luz UV. La lectura de los halos de actividad fue observada a los 2-5 días de incubación en anaerobiosis y a la temperatura correspondiente. Para *Enterococcus* se usó agar TSA crema 1%-Tween 20 0,4% y agar TSA tributirina 1%- Tween 20 0,4%. La lectura de los a halos de actividad se midieron a los 2-5 días de incubación.

Producción de exopolisacáridos: Esta actividad se evaluó en base a la presencia de filancia de las cepas, características de la colonia (brillo) y tinción con tinta china. Para la producción de exopolisacáridos, las evidencias disponibles recomiendan utilizar varios azúcares incorporados a los medios de cultivo en alta concentración. Los mejores resultados han sido obtenidos con glucosa y sucrosa (Ruas-Madiedo et al). Es por ello que para *Lactobacillus* se empleo agar MRS con 5% de glucosa y MRS con 5% de sucrosa. La filancia se determinó a los 2 días de incubación. Respecto a *Enterococcus* se usó agar TSA con 5% de glucosa y TSA con 5% de sucrosa y la lectura también se realizó a las 48 hrs. Como cepas de referencia fue usada *Klebsiella pneumoniae* ATCC3883. En el caso de *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* el crecimiento se realizo en medio M17 suplementado con 2% de sacarosa, puesto que se reporto mejores resultados en ensayos preliminares. Se utilizó tinta china para visualizar la capsula en estas cepas lácticas, crecidas en leche descremada al 10%, pues se ha descrito que esta condición favorecería la formación de capsula. La cuantificación total se realizo de acuerdo a la metodología de Tallon R. et al., para la extracción de EPS, seguida de la determinación colorimétrica del contenido de azúcar total según la metodología de Dubois usando glucosa como estandar. Los resultados se expresaron como $\mu\text{g/ml}$ de glucosa.

Producción de diacetilo: Esta propiedad se evaluó a través de la reacción de Vogues Proskauer, técnica colorimétrica donde el diacetilo reacciona con el grupo guanido de la creatina en presencia de α -naftol medio alcalino, observándose desarrollo de color rojo cereza intenso. Esta técnica resultó mas conveniente que la de Monet et al., propuesta en el proyecto original, ya que permite evaluar un gran número de cepas, como en este caso, a través de un procedimiento sencillo con rápida lectura de los resultados. En el caso de *Lactobacillus* la prueba Vogues Proskauer se realizó en cultivos en caldo MRS, mientras que para *Enterococcus* se usó caldo VP suplementado con citrato 0.2%. Las evidencias en la literatura señalan que la adición de citrato tiene un efecto positivo sobre la producción de diacetilo (Petit et al.). En el caso del caldo MRS no se agregó dado que este medio lo tiene incorporado en su formulación de base. Como control positivo se usó la cepa *Enterobacter aerogenes* de origen alimentario. El contenido en diacetilo de las muestras se cuantificó por cromatografía gaseosa, según lo descrito por Lee y Drucker (J Clin Microbiol 1975). En breve, 10 a 20 ml de del sobrenadante se extrajeron con un volumen de dietil eter que contenía 0.2% (v/v) de acetato de etilo como estándar interno, utilizando un embudo de decantación, y luego se recolectó la fase orgánica. Se inyectaron 2 μl de eter en un cromatografo de gas Varian 3600 equipado con una columna capilar de 30 metros (Stabilwax-DA, Resteck, USA) y con un detector de ionización de llama (FID). El tiempo de elusión del diacetilo se determino usando diacetilo comercial (Fluka).

Actividad acidificante: Las bacterias lácticas durante la fermentación producen ácido láctico como principal metabolito de la degradación de carbohidratos. La capacidad de producir ácido así como la velocidad de producción, son fundamentales en la selección de cepas para ser usadas en la

producción de quesos. Esta propiedad se cuantificó según lo publicado por Zaika y col. En breve, se usó medio de Zaika inoculado al 2% con un cultivo de la cepa en estudio y se incubó por 30 minutos a 30°C. La acidez titulable se midió a las 24 horas. La velocidad de acidificación fue expresada como los ml de NaOH 0.1N requeridos para neutralizar el medio a pH 7 en presencia de fenoltaleína.

Actividad proteolítica: Se efectuó por medición de la liberación de aminoácidos solubles en ácido tricloroacético (TCA) empleando el método espectrofotométrico de OPA (Church y col.). Para ello las cepas fueron colectadas por centrifugación a partir de un cultivo en leche descremada al 10% de 24 horas. Luego se realizó una suspensión al 2% en el mismo medio para someterlas a una desproteínización con TCA. Por centrifugación se separó el sobrenadante (50 µl) el cual reaccionó con reactivo de OPA (1 ml). Luego de 5 minutos se leyó la densidad óptica (DO) a 340 nm.

Actividad antibacteriana. Se determinó la actividad antibacteriana de todas las cepas frente a patógenos de alimentos. Inicialmente fue necesario evaluar el crecimiento de las cepas lácticas en agar MH (pH 5.0 y pH7), medio de cultivo en el cual se realiza el ensayo. Se realizó por la técnica de spot en agar que consiste en diseminar sobre la superficie de agar Muller Hinton la cepa blanco (*Salmonella*, *Shigella* o *Staphylococcus aureus*) en una concentración de 10⁶ UFC/ml y posteriormente sembrar un spot de 5 µl de un cultivo de la cepa test correspondiente. Las placas fueron incubadas en aerobiosis a 30°C y la lectura de los halos de inhibición se realizó a los 7 días. Las cepas de *Leuconostoc* y *Lactococcus* se evaluaron en un ensayo de doble capa, en un medio en condiciones de neutralidad para evaluar el efecto de otros mecanismos inhibitorios, como peróxido de hidrógeno o bacteriocinas.

2.5. Estudio de la evolución de la flora láctica durante el proceso de fabricación del queso

A partir de las muestras de leche y quesos almacenadas a -20°C se estudió el perfil general de la microflora láctica mediante PCR y Gel de Electroforesis en Gradiente de Temperatura (TTGE). El DNA bacteriano presente en las muestras de leche y de queso, así como en los cultivos bacterianos utilizados como marcadores se aislaron de acuerdo al protocolo de Ogier et al. modificado (AEM 2002, 3691-3701). 14 g de leche o 2 g de queso se homogenizaron en buffer citrato y luego se centrifugaron 15 min a 15.000g para obtener las células bacterianas. Las células fueron resuspendidas en buffer TRIS, 4M isotiocianato de guanidinio y con SDS, incubadas 1 hora a 70°C y luego batidas con 750µL de esferas de zirconio en un Bead-beater 2 veces 5 minutos. Luego se agregó PVPP y se centrifugó 3 min a 15.000g para obtener el sobrenadante. El DNA fue extraído con isopropanol, se purificó por precipitación con etanol y se almacenó en buffer TE a -20°C. La calidad del DNA obtenido se verificó por gel de agarosa al 1,2%. El DNA obtenido se amplificó mediante PCR utilizando los partidores universales HDA1-GC y HDA2 que amplifican 200 pb (339-359) de la región V2 y V3 del rADN 16S de bacterias, y Platinum® Taq DNA Polimerasa (Invitrogen). La electroforesis en gradiente de temperatura (TTGE) se realizó con un aparato BioRad Dcode System y los geles se tñieron con SyberSafe, luego se les sacó fotos. Como marcadores se utilizaron DNA aislados a partir de cultivos de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, y amplificados con los mismos partidores.

2.6. Selección de cepas lácticas en base a sus propiedades tecnológicas relevantes para producir los fermentos lácticos que serán usados en la elaboración de queso de cabra en planta piloto

Conforme a los resultados de la cuantificación de cada una de las propiedades tecnológicas mencionadas, se seleccionó a 10 cepas que mostraron actividad alta y media y la expresión de más de una propiedad tecnológica. En base a estos resultados se diseñó 6 fermentos lácticos que serían utilizados en la elaboración de quesos a nivel piloto y definió cada una de las cepas que lo conformarían.

Previo a la elaboración de los fermentos se realizó curvas de crecimiento bacteriano de las cepas seleccionadas. Para ello cada cepa seleccionada fue cultivada en caldo MRS o Caldo M-17 a 37°C, en anaerobiosis por 29 horas. Se midió espectrofotométricamente la densidad bacteriana en diferentes tiempos (0, 3, 6, 12, 24 y 29 horas) y se determinó los recuentos bacterianos en medios de cultivos específicos para cada cepa. Esta actividad permitió evaluar el crecimiento bacteriano de cada cepa, identificar su fase de crecimiento exponencial y estandarizar los inóculos.

2.7. Selección de la planta piloto

Para la selección de la planta a utilizar en la elaboración de los quesos, se utilizó el siguiente criterio: 1) que la planta tuviera una construcción adecuada y que permitiera la producción segura de los quesos, 2) que contara con un equipo de pasteurización de la leche y 3) que los resultados de la encuesta de cumplimiento de buenas prácticas fueran satisfactorios. En éste sentido solo una quesería cumplió con la totalidad de los requerimientos y en consecuencia fue utilizada para la primera elaboración de los quesos con fermentos seleccionados.

2.8. Elaboración de los quesos en planta piloto

En esta fase se elaboró 6 quesos experimentales con las cepas seleccionadas y un control, que se elaboró bajo las mismas condiciones utilizadas en la quesería "Las Majadas" y bajo la supervisión del Sr. Juvenal Cortés. Finalizada su maduración a los 30 días fueron trasladados al Laboratorio de Microbiología del INTA y la UTEM para su posterior análisis.

Las mezclas utilizadas fueron las siguientes:

Fermento N°1: Corresponde a la mejor cepa de cada una de las propiedades tecnológicas probadas.

Fermento N°2: Incluye una cepa acidificante y productora de EPS, una proteolítica y una productora de diacetilo.

Fermento N°3: Incluye dos cepas acidificantes, una productora de diacetilo y una proteolítica y lipolítica.

Fermento N°4: Incluye una cepa con actividad lipolítica, una proteolítica y una acidificante.

Fermento N°5: Incluye una cepa con actividad lipolítica, una proteolítica, una acidificante y una EPS.

Fermento N°6: Incluye una cepa con actividad lipolítica, una proteolítica una acidificante y una EPS en mayor proporción (1,5).

2.9. Evaluación de la inocuidad de los quesos experimentales

En cada uno de los quesos obtenidos se determinó la presencia de microorganismos indicadores y patógenos según lo especificado por el RSA. Se determinó presencia de Salmonella, recuento *S. aureus* y de Enterobacteriaceas. Todos estos parámetros fueron evaluados según la metodología recomendada por el Manual de Análisis Bacteriológico, BAM -8 (FDA).

2.10. Evaluación de la calidad de los quesos y selección de los mejores fermentos

Se evaluó los parámetros de apariencia, aroma, sabor y textura. Para ello se utilizó el test de valoración - descriptivo, con escala de Karlsruhe en amplitud de 9 puntos, en la cual 1 indica que el parámetro evaluado está muy disminuido y 9 que cumple con lo óptimo para el producto. Se evaluó además la aceptabilidad empleando una escala hedónica de nueve puntos, en que 9 corresponde a "me gusta extremadamente" y 1 "me disgusta extremadamente".

Los mejores mezclas de fermentos se seleccionaron en función de las notas entregadas por el Panel de Evaluación Sensorial

2.11. Identificación de los fermentos seleccionados

La caracterización fenotípica de los fermentos seleccionados se realizó en base a características microscópicas (Tinción de Gram), características culturales, pruebas bioquímicas (catalasa, reducción de nitritos, movilidad e Indol) y la identificación final de especie por fermentación de carbohidratos mediante galerías API CH50 y software API web 4.0.

Caracterización de las cepas seleccionadas: En las 10 cepas seleccionadas se evaluó la susceptibilidad a los antibióticos y determinó la presencia de elementos genéticos extracromosómicos o plasmidios.

La susceptibilidad a antibióticos fue evaluada mediante la metodología de difusión en agar según recomendaciones de la NCCLS en agar Brucella con 5% de sangre de cordero, suplementado con Vitamina K1 (1 ug/ml) y Hemina (5ug/ml) excepto para *Enterococcus* que fue evaluado en Muller Hinton con 5% de sangre. Los antibióticos ensayados para cada uno de los géneros bacterianos fueron:

- *Lactobacillus sp*: penicilina, ampicilina, amoxicilina, cefoxitima, vancomicina, tetraciclina, eritromicina, metronidazol, gentamicina, kanamicina, cloranfenicol y clindamicina.
- *Enterococcus sp*: ampicilina, ciprofloxacino, vancomicina y gentamicina.
- *Lactococcus sp*: penicilina, ampicilina, eritromicina, cloranfenicol, vancomicina y clindamicina.

La detección de plasmidios se realizó según lo propuesto por: O'Sullivan, et al (1993). En breve a partir de un cultivo overnight se obtiene el pellet bacteriano el que es resuspendido en solución de Buffer TES con lisozima 30 mg/ml, seguida por una lisis alcalina y extracción con fenol cloroformo. La visualización de los plasmados se realiza en geles de agarosa al 0.7% teñidos con bromuro de Etidium.

2.12. Capacitación de los productores

Durante el desarrollo del proyecto se llevaron a cabo tres capacitaciones, donde se entregaron desde conceptos generales de buenas prácticas hasta microbiología básica de alimentos.

La primera para entregar conceptos generales de inocuidad de alimentos (Buena Prácticas Agrícolas y Buenas Prácticas Manufacturas) a los productores participantes. Además durante esta capacitación se dio a conocer la inclusión de una nueva actividad, como es la implementación de encuestas de pre-auditoría de cumplimiento de prerrequisitos para HACCP de las plantas queseras, con la finalidad de orientar las siguientes actividades de capacitación según las necesidades de los productores (Anexo 2).

La segunda capacitación tuvo por objetivo profundizar en temas relacionados a la inocuidad del producto y peligros de contaminación. En ésta se analizaron temas específicos relacionados con la inocuidad del queso de cabra y los principales peligros de contaminación y sus métodos de control. Además se entregaron los resultados parciales obtenidos hasta la fecha y se explicó a los asistentes el sistema de selección de las queserías que participarían en la siguiente etapa, correspondiente a la preparación de quesos con las seis mezclas de fermentos seleccionados inicialmente.

En la tercera y última capacitación, se entregaron conceptos más específicos sobre microbiología de alimentos, los patógenos que pueden contaminar los alimentos, la importancia del lavado de manos y equipos y las consecuencias de la contaminación.

2.13. Principales problemas metodológicos enfrentados

El número de bacterias lácticas aisladas fue muy superior al estimado en la propuesta original (360 vs 507) motivo por el cual la identificación de especie se realizó solo en aquellas cepas seleccionadas como fermentos para ajustarse al presupuesto solicitado. Por el mismo motivo en la caracterización de propiedades tecnológicas como estrategia, en una primera etapa se implementó métodos de screening para evaluar la producción de exopolisacáridos, diacetilo y actividad lipolítica en los aislados. En las cepas que resultaron positivas se cuantificaron estas propiedades y posteriormente en una segunda etapa se determinó las actividades acidificantes, proteolíticas y antibacterianas.

2.14. Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto y razones que explican las discrepancias con las metodologías originalmente propuesta

La realización de los test para la evaluación de actividad lipolítica fue necesario evaluar varios sustratos para definir el medio de cultivo que se usó finalmente. Para la cuantificación de exopolisacárido con la metodología originalmente propuesta los resultados obtenidos fueron negativos, razón por la cual se implementó la técnica de Tallon *R. et al.*, para la extracción de EPS, seguida de la determinación colorimétrica del contenido de azúcar total según la metodología de Dubois usando glucosa como estándar. Los resultados se expresaron como $\mu\text{g/ml}$ de glucosa. Esta metodología es recomendada por la literatura para este tipo de cepas.

3. Actividades y tareas ejecutadas

Actividad Programada	Actividad Realizada	Descripción de la Actividad	Observaciones
Selección de Productores	Selección de Productores	Se seleccionó a 18 productores de la IV Región para la obtención de muestras de leche y quesos (INPROA).	Se incluyó a un número de productores mayor al propuesto (18). Además se obtuvo muestras aleatorias de 8 productores que no participaron en forma activa en el proyecto. Todo esto con el fin de aumentar las posibilidades de bio-diversidad de las cepas lácticas.
Capacitación del personal en toma de muestras	Capacitación del personal en toma de muestras	Se capacitó al Sr. Juvenal Cortés en la correcta toma de muestras y envío de las mismas al laboratorio de Microbiología del INTA en Santiago.	No hay
Reunión de apertura	Ceremonia de Lanzamiento y capacitación inicial de productores en BPA/BPM	Se efectuó acto con la asistencia de autoridades locales, representantes de FIA, INTA, UTEM e INPROA y 30 productores de queso de cabra	Se aprovechó la oportunidad para realizar una capacitación inicial en higiene e inocuidad a los productores participantes.
Toma de muestras	Toma de muestras	El Sr. Juvenal Cortés (INPROA) realizó 10 tomas de muestras en las queserías y las envió al Laboratorio en Santiago	No hay
Detección de patógenos e indicadores	Detección de patógenos e indicadores	A la totalidad de las 100 muestras recibidas se les efectuó determinación de patógenos e indicadores según lo estipulado en el RSA	No hay
Aislamiento de bacterias lácticas de leche y queso de cabra.	Aislamiento de bacterias lácticas	El laboratorio de Microbiología del INTA aisló de <i>Lactobacillus</i> termófilos (45) y mesófilos (143) y <i>Enterococcus</i> (130). La UTEM efectuó el aislamiento de los géneros <i>Lactococcus</i> , (79) <i>Streptococcus</i> (61) y <i>Leuconostoc</i> (49).	No hay



Identificación fenotípica y genotípica de las bacterias lácticas	Identificación fenotípica de bacterias lácticas	La identificación fenotípica se realizó en base a tinción de Gram, características culturales y pruebas bioquímicas.	La identificación genotípica se efectuó una vez finalizada la caracterización de propiedades tecnológicas.
No existe	Encuesta de evaluación de prerequisites e higiene	Se diseñó y aplicó una encuesta de cumplimiento de BPA/BPM a los 18 productores participantes en el proyecto, con el fin de definir el estado de implementación de BPA/BPM.	Se consideró necesario realizar una encuesta para determinar la situación de higiene e inocuidad de los productos muestreados para orientar mejor la capacitación programada.
Curso de capacitación a productores en BPA/BPM – higiene de alimentos	Curso de capacitación a productores en BPA/BPM – higiene de alimentos	Capacitación a productores participantes (18) en prácticas de higiene e inocuidad	
Estudio de evolución de la flora láctica	Estudio de evolución de la flora láctica	Se extrajo y se amplificó el DNA de las muestras y se realizó TTGE	No hay
Informe de resultados de caracterización	Informe de resultados de caracterización	Resumen de la caracterización de las propiedades tecnológicas de las cepas de bacterias lácticas aisladas	Informe de resultados de caracterización
Screening de cepas productoras de diacetilo	Screening de cepas productoras de diacetilo	Se evaluó las 507 cepas aisladas mediante reacción colorimétrica.	No hay
Screening de cepas con actividad lipolítica	Screening de cepas con actividad lipolítica	Se evaluó las 507 cepas aisladas utilizando el test de difusión en agar.	No hay
Screening de cepas productoras de exopolisacáridos	Screening de cepas productoras de exopolisacáridos	Se evaluó las 507 cepas aisladas en base a la presencia de filancia de las cepas, características de la colonia y tinción con tinta china.	No hay



Curso de capacitación a productores en BPA/BPM – Microbiología de alimentos	Curso de capacitación a productores en BPA/BPM – Microbiología de alimentos	Capacitación a productores participantes en Inocuidad en la producción de queso de cabra y microbiología de alimentos	Producto del resultado de las encuestas implementadas, se determinó que la aplicación de un curso de implementación de BPA y BPM era prematuro en este grupo de productores, por lo que se optó por un curso de higiene y peligros microbiológicos.
Presentación de resultados en Congreso	Presentación de resultados en XXVII Congreso Chileno de Microbiología	Se presentan dos trabajos relacionados al proyecto	No hay
Publicación	No se realizó	Envío de Publicación en Revista Journal Food Protection u otra de similar impacto	Producto de los buenos resultados del proyecto se evaluó la posibilidad de patentar las cepas seleccionadas. Por esto, en una reunión entre el abogado de la Universidad y el de FIA, se acordó suspender esta actividad hasta no contar con algún tipo de protección de la información.
Screening de cepas con actividad proteolítica	Screening de cepas con actividad proteolítica	Se evaluó las 507 cepas aisladas mediante medición de la liberación de aminoácidos solubles en ácido tricloroacético (TCA) empleando el método espectrofotométrico de OPA	No hay
Screening de cepas con actividad acidificante	Screening de cepas con actividad acidificante	Se evaluó las 507 cepas aisladas mediante medio Zaika al 2%	No hay
Screening de cepas con actividad antibacteriana	Screening de cepas con actividad antibacteriana	Se determinó la actividad antibacteriana de todas las cepas frente a patógenos de alimentos.	No hay
Informe de propiedades tecnológicas	Se incluye en este informe	Resumen de la caracterización de las propiedades tecnológicas de las cepas de bacterias lácticas aisladas	No hay
Selección de mezclas a usar como fermentos	Selección de mezclas a usar como fermentos	Se seleccionaron 10 cepas con características tecnológicas deseadas, las que en diferentes combinaciones dieron	No hay



		origen a los 6 fermentos a utilizar durante la producción de quesos	
Producción y conservación de mezclas de fermentos	Producción y conservación de mezclas de fermentos	Se formularon 6 fermentos para la producción de quesos	No hay
Elaboración de quesos de cabra con las mezclas de fermentos seleccionados	Elaboración de seis quesos experimentales y de un queso control	Se elaboraron quesos con leche de cabra pasteurizada en una planta seleccionada. Como control se usó un fermento comercial. Los quesos se dejaron madurar durante 1 mes.	No hay
Evaluación de la inocuidad de los quesos	Evaluación de la inocuidad de los quesos	Control microbiológico según RSA de los 7 quesos (6 ensayos + 1 control). Recuentos de Enterobacteriaceas, Salmonella, y <i>S. aureus</i> en los 7 quesos de cabra	Los quesos de cabra presentaron recuentos de Enterobacteriaceas levemente inferiores a los establecidos por el RSA.
Evaluación de la calidad de los quesos	Evaluación de la calidad de los quesos	Se realizó un panel de evaluación sensorial que evaluó la apariencia de los quesos, su textura y sus cualidades organolépticas	5 de los 6 quesos experimentales fueron evaluados mejor que el control.
Presentación de resultados en Congreso	Presentación de resultados en XXVIII Congreso Latinoamericano de Microbiología	Se presentan 5 trabajos relacionados al proyecto	No hay
Identificación fenotípica de los fermentos seleccionados	Identificación fenotípica de los fermentos seleccionados	10 cepas identificadas mediante utilización de galerías API	No hay
Elaboración de quesos de cabra en distintas queserías, con las mezclas seleccionadas	Elaboración de quesos de cabra en distintas queserías, con las mezclas seleccionadas	Se elaboraron 2 quesos con los fermentos seleccionados.	No hay
Evaluación de la inocuidad de los quesos	Evaluación de la inocuidad de los quesos.	Se evaluarán los mismos parámetros considerados en el punto anteriormente	No hay
Evaluación de la calidad de los quesos	Evaluación de la calidad de los quesos	Se realizó un panel de evaluación sensorial que evaluó la apariencia de los quesos, su textura y sus cualidades organolépticas	Los dos quesos experimentales fueron evaluados mejor que el control.



4. Resultados del proyecto

Los resultados que se informan corresponden a las actividades realizadas entre enero de 2005 y enero de 2007. Conforme a los objetivos propuestos en el proyecto, los resultados finales del proyecto son:

Objetivo Específico 1: Aislar, caracterizar y conservar las bacterias lácticas presentes en las diferentes etapas de elaboración de queso de cabra artesanal.

La selección de cepas de bacterias lácticas se mantuvo de acuerdo al diseño original de la propuesta, es decir, fueron obtenidas un total de 100 muestras provenientes de tres etapas de la producción de queso de cabra artesanal, como son leche de cabra, queso de 15 días y queso de 30 días de maduración. Los productos fueron obtenidos plantas queseras de la IV Región. El número de productores que participaron de forma directa en el proyecto fue de 18, más 8 productores que aportaron en forma esporádica. Además, entre éstos se incluyeron 5 productores cordilleranos, que aportaron mayor diversidad de cepas lácticas.

A partir de las muestras obtenidas se aislaron en total 507 cepas de bacterias lácticas pertenecientes a los siguientes Géneros bacterianos: *Lactobacillus*, termófilos y mesófilos, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus*.

- *Enterococcus sp*: 130 cepas
- *Lactobacillus mesófilos*: 143 cepas
- *Lactobacillus termófilos*: 45 cepas
- *Lactococcus*: 79 cepas
- *Leuconostoc*: 49 cepas
- *Streptococcus sp*: 61 cepas

Cuadro

Estas cepas permanecen almacenadas en el cepario del Laboratorio de Microbiología del INTA y UTEM.

En 7 casos que se dispuso de las muestras de quesos de 15 y 30 días de maduración, correspondiente al mismo productor, se estudió la evolución de la flora láctica. Los resultados mostraron que no existían diferencias significativas entre las poblaciones bacterianas estudiadas a los 15 días de maduración (p 0.11) (Tabla 2). Esto revela que no hay una población predominante durante este periodo, sin embargo, se observa que el genero *Streptococcus* presenta un recuento inferior al de las otras bacterias presentes (Mediana 10x10 UFC/gr). Hacia el final de la maduración (30 días) la situación cambia y se observa un claro predominio de *Lactobacillus mesófilos* respecto a *Lactobacillus termófilos* (p 0.04). *Lactococcus sp.* aparece como la segunda y *Streptococcus sp* como la tercera población importante en este tipo de quesos, a pesar que la diferencia en recuentos no alcance la significancia estadística (Tabla 3). En la Figura 1 se observa la evolución de las poblaciones durante todo el periodo de maduración, los valores corresponden a la mediana de los recuentos de cada uno de los géneros bacterianos estudiado.



Tabla 2. Recuentos de distintos géneros bacterianos (UFC/gr) en quesos de cabra artesanal de 15 días de maduración. Los valores de la última fila corresponden a las medianas de cada uno de los géneros.

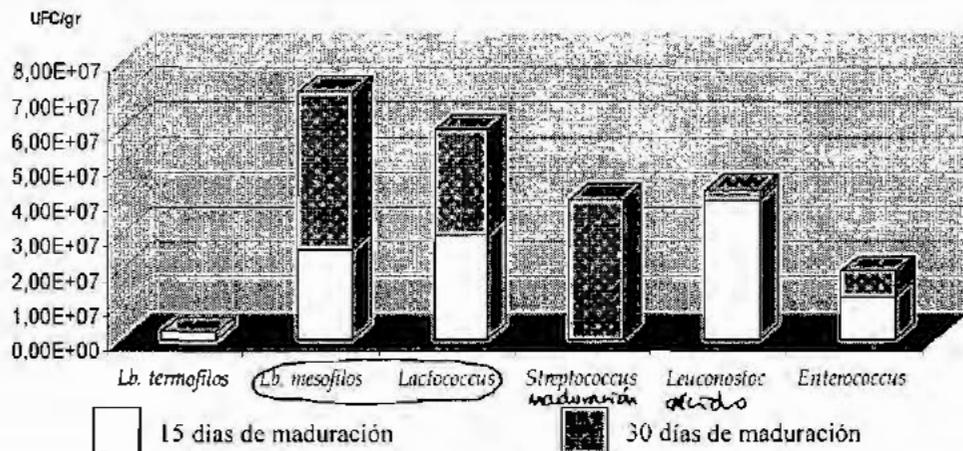
<i>Lb. mesofilos</i>	<i>Lb. termófilos</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>
38×10^7	70×10^5	38×10^6	40×10^7	46×10^6	54×10^6
10x10	10x10	32×10^8	15×10^6	87×10^7	10
16×10^6	10x10	10	80×10^6	30×10^6	37×10^6
14×10^7	16×10^7	10	15×10^6	22×10^6	17×10^7
11×10^7	20×10^5	10	19×10^5	47×10^4	10
23×10^6	19×10^6	10	12×10^6	30×10^6	40×10^6
26×10^6	10x10	10	70×10^5	30×10^7	52×10^6
26×10^6	20×10^5	10x10	12×10^6	30×10^6	40×10^6

Tabla 3. Recuentos de distintos géneros bacterianos (UFC/gr) en quesos de cabra artesanal de 30 días de maduración. Los valores de la última fila corresponden a las medianas de cada uno de los géneros.

<i>Lb. mesofilos</i>	<i>Lb. termófilos</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>
10	20×10^7	10x10	33×10^6	29×10^7	15×10^7
14×10^7	67×10^6	10x10	18×10^6	10x10	67×10^6
80×10^5	10	10x10	75×10^5	11×10^6	42×10^6
10×10^6	17×10^7	10x10	16×10^5	66×10^6	10
30×10^6	40×10^6	60×10^3	60×10^4	68×10^6	10×10^5
45×10^6	24×10^5	22×10^6	28×10^6	45×10^6	10
40×10^6	20×10^5	50×10^2	60×10^5	12×10^6	30×10^5
45×10^6	10x10	40×10^6	75×10^5	30×10^6	30×10^5



Figura 1. Comportamiento de las poblaciones bacterianas durante la maduración de quesos de cabra artesanal.



Lactobacillus mesófilos y *Lactococcus sp.* se mantuvieron con valores constante durante todo el periodo evaluado, lo que sugiere el importante rol que juegan estas bacterias tanto en la fase de acidificación inicial, como en la maduración de este queso fresco (propiedades proteolíticas y lipolíticas). *Enterococcus sp.* también se presenta con recuentos elevados hasta la fase final, lo que puede obedecer en parte a la tolerancia a diversas condiciones ambientales que tienen estas bacterias. Con respecto a (*Leuconostoc*) su mayor nivel lo obtienen a los 15 días de maduración, lo que coincide con su capacidad de producir y tolerar condiciones de acidez. (*Lactobacillus termófilos*) disminuyen bruscamente sus recuentos luego de los 15 días lo que se explica por las condiciones de temperatura de maduración de estos quesos (20-25° C). Inversamente (*Streptococcus*) *sp.* alcanza valores importantes en la segunda fase lo que sugeriría un mayor rol durante la maduración.

Control de calidad microbiológica de las muestras. En la totalidad de las muestras recolectadas se determinó además la presencia de microorganismos patógenos e indicadores según lo especificado en el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA). Esto incluyó el recuento de (*Enterobacteriaceas*) y de (*S. aureus*), y la detección de (*Salmonella*) y en leche cruda además se determinó el Recuento de Aerobios Mesófilos (RAM). Los resultados muestran (Tabla 4) un alto porcentaje de muestras (72%) que no cumplen el parámetro Enterobacteriaceas establecido en el RSA. Esto sugiere que hay deficiencias de las condiciones de higiene durante la elaboración de estos productos y enfatiza la necesidad de capacitación de los productores artesanales. Los recuentos más altos fueron detectados en muestras de leche (10^8 UFC/ml) y quesos con 30 días de maduración (10^9 UFC/g o ml). El patógeno *S. aureus* solo se detectó en muestras de queso (11%, 7/63) y para *Salmonella* todas las muestras fueron negativas.

Tabla 4. Evaluación microbiológica de leche, suero y quesos de cabra artesanales provenientes de la IV Región

Parámetros microbiológicos	Muestras que no cumplen RSA			
	Leche N (%)	Q15 N (%)	Q30 N (%)	Suero N (%)
RAM	8/29 (28)	n/a	n/a	n/a
Enterobacterias	15/29 (52)	24/30 (80)	27/33 (82)	6/8 (75)
Salmonella	0	0	0	0
S. aureus	0	2/30 (6)	5/33 (15)	0

Estudio de la evaluación de la biodiversidad de la flora láctica durante el curso del proceso de fabricación de queso de cabra. Este objetivo también incluyó el estudio de la evaluación de la biodiversidad de la flora láctica durante el curso del proceso de fabricación de queso de cabra. Para ello se extrajo el DNA de muestras del valle y de la cordillera.

Muestras de leche: De un total de 21 muestras de leche sólo fue posible extraer ADN en 10. De esas 10 muestras, 7 fueron analizadas mediante PCR-TTGE con partidores HDA1-HDA2 y sólo una con los partidores LAC; en las demás muestras el PCR no dio resultado. En las 7 muestras analizadas con los partidores HDA1-HDA2 se observaron a lo más 2 bandas por carril y se identificaron los géneros *Lactococcus* y *Streptococcus*. En la muestra analizada con los partidores LAC se identificó *Leuconostoc*. Debido al bajo número de muestras de leche analizadas y a que estas sólo provenían de valle, no se consideraron los datos correspondientes en los análisis posteriores.

Identificación de las bandas dominantes observadas en los TTGE:

a) TTGE con partidores dirigidos a eubacterias (HDA1 y HDA2): Se analizaron, mediante PCR-TTGE con partidores HDA1-HDA2, 56 muestras de queso con 15 días o 30 días de maduración (Q15 y Q30) provenientes de productores de valle y cordillera. Se observaron de 1 a 3 bandas por carril, correspondientes a la microbiota dominante (Figuras 2 y 3). Al menos dos bandas con igual movilidad electroforética fueron eluidas, reamplificadas y secuenciadas. Al total se secuenciaron 24 bandas dominantes observadas en los perfiles de TTGE pertenecientes a 14 de las 56 muestras analizadas.



Figura 2. Perfiles TTGE de los amplicones obtenidos con partidores dirigidos a eubacterias (HDA1 – HDA2) de muestras de quesos de 15 y 30 días obtenidas de productores de valle. A, B y C son las bandas dominantes. La identidad de las bandas se encuentra detallada en la **Tabla 5**.

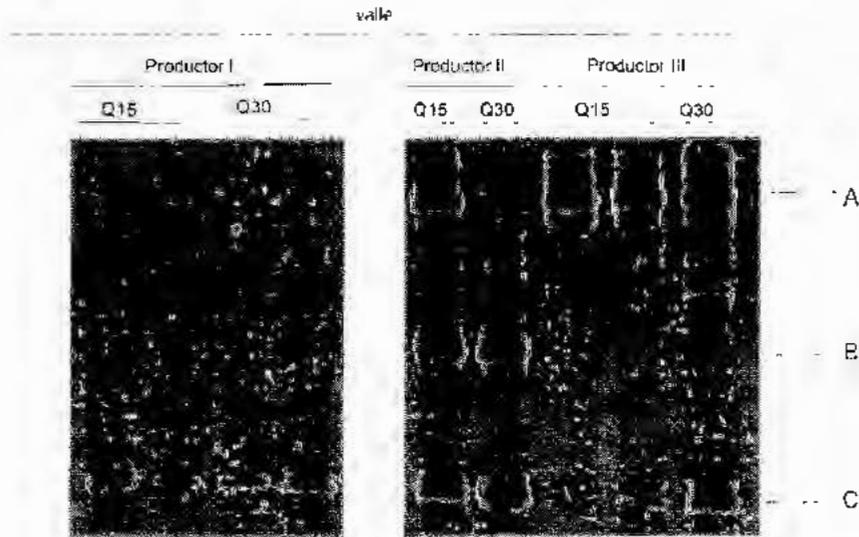
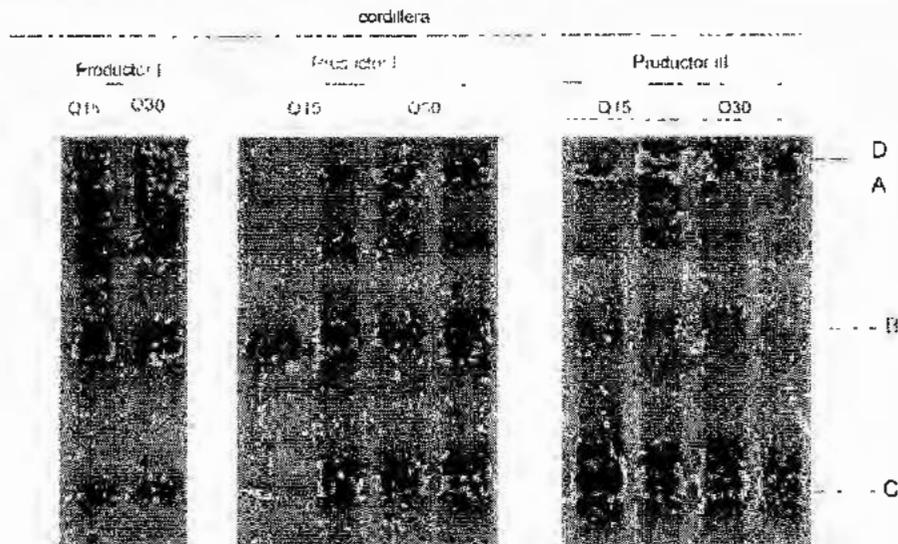


Figura 3. Perfiles TTGE de los amplicones obtenidos con partidores dirigidos a eubacterias (HDA1 – HDA2) de muestras de quesos de 15 y 30 días obtenidas de productores de cordillera. A, B y C son las bandas dominantes. La identidad de las bandas se encuentra detallada en la **Tabla 5**.



Mediante secuenciación del ADNr 16S con HDA1 estas bandas fueron identificadas como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Weissella* con un 100% de similitud con las secuencias depositadas en la base de datos RDPII (Tabla 5).



Tabla 5. Géneros bacterianos identificados mediante secuenciación con partidores HDA1 – HDA2

bandas	Correspondencia con género	Identidad (%)	largo secuencia (pb)	zona geográfica		maduración	
				valle (F)	cordillera (F)	Q15 (F)	Q30 (F)
A	<i>Lactobacillus</i>	100	100	16 (34%)	8 (35%)	15 (60%)	12 (48%)
B	<i>Streptococcus</i>	100	100	15 (32%)	9 (39%)	14 (56%)	13 (52%)
C	<i>Lactococcus</i>	100	100	39 (83%)	19 (83%)	24 (96%)	24 (96%)
D	<i>Weissella</i>	100	100	0 (0%)	5 (22%)	1 (4%)	2 (8%)

b) **TTGE con partidores dirigidos a bacterias lácticas (LAC1 y LAC2):** 48 muestras de Q15 y Q30 fueron evaluadas por PCR-TTGE con partidores LAC1-LAC2 para bacterias lácticas. Se observaron de 1 a 2 bandas por carril, correspondientes a la microbiota dominante. Al menos dos bandas de idéntica migración fueron eluidas, reamplificadas y secuenciadas. 27 bandas dominantes fueron escindidas de los geles de TTGE y secuenciadas. Los perfiles de 19 muestras amplificadas con estos partidores se muestran en las Figuras 4 y 5.

Figura 4. Perfiles TTGE de los amplicones obtenidos con partidores dirigidos a bacterias lácticas (LAC1 – LAC2) de muestras de quesos de 15 y 30 días obtenidas de productores de valle. E y F son las bandas dominantes. La identidad de las bandas se encuentra detallada en la Tabla 6.

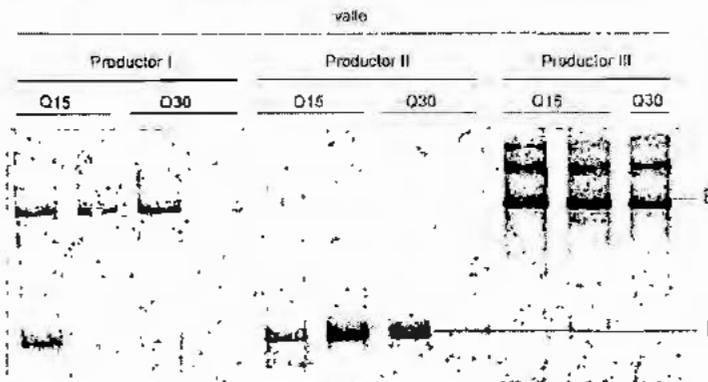
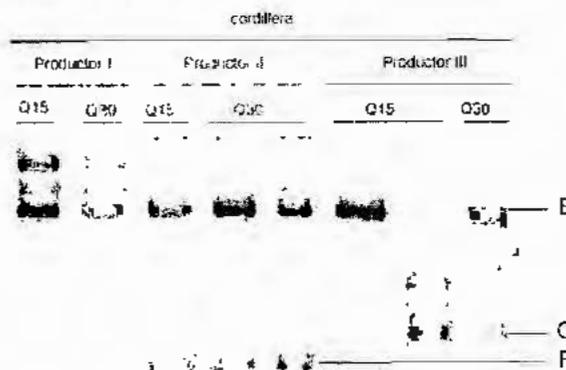
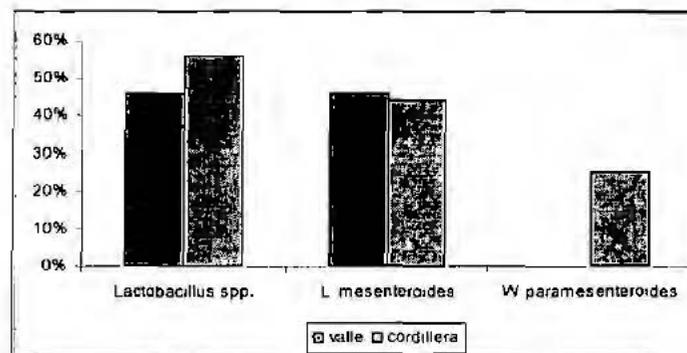


Figura 5. Perfiles TTGE de los amplicones obtenidos con partidores dirigidos a bacterias lácticas (LAC1 – LAC2) de muestras de quesos de 15 y 30 días obtenidas de productores de cordillera. E, F y G son las bandas dominantes. La identidad de las bandas se encuentra detallada en la Tabla 6.



b) **Frecuencia de cada especie bacteriana analizada con partidores dirigidos a bacterias lácticas:** En 45 muestras analizadas mediante TTGE con LAC1-LAC2, 31 provenientes de valle y 14 de cordillera, las bandas dominantes corresponden a las especies *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc mesenteroides* y *Weissella paramesenteroides*. En ambas zonas geográficas *Lactobacillus* spp. y *Leuconostoc mesenteroides* presentan una frecuencia similar (Figura 7 y Tabla 6). La especie *Weissella paramesenteroides* sólo se encontró en un 25% de las muestras pertenecientes a cordillera (Tabla 6).

Figura 7. Frecuencia de especies bacterianas identificadas mediante secuenciación con LAC1 – LAC2 según zona geográfica



Composición de la microbiota láctica en quesos con 15 y 30 días de maduración. A través de las frecuencias correspondiente a los géneros (HDA) o especies (LAC) bacterianas anteriormente descritos en los perfiles de TTGE de muestras de Q15 y Q30 de ambas zonas geográficas se analizó la composición de la microbiota láctica en dos estadios de la maduración. El universo de muestras en este análisis fue de 56 muestras en frecuencia de géneros bacterianos (HDA) y 45 muestras en frecuencia de especies bacterianas (LAC). En las Figuras 8 y 9 se observa que la frecuencia no varía significativamente entre Q15 y Q30. El género *Lactococcus* es el más frecuente encontrándose en un 96% de las muestras. Los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* se encuentran en más del 50% de las muestras de ambos estadios de maduración. *Weissella* es el género bacteriano menos frecuente encontrándose sólo en un 6% de las muestras de Q15 y Q30 (Tabla 5 y 6).

Figura 8. Frecuencia de géneros bacterianos identificados con HDA 1 – HDA 2 según maduración

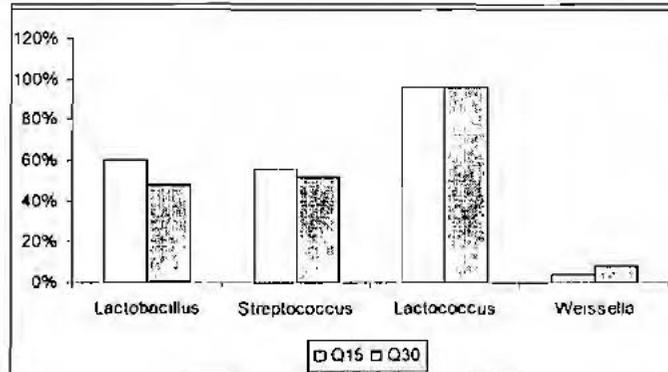
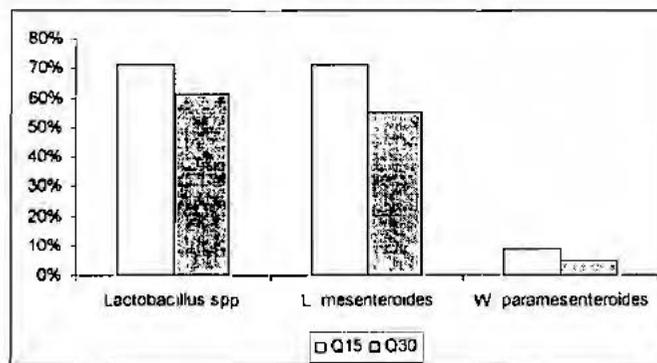


Figura 9. Frecuencia de especies bacterianas identificadas mediante LAC1 – LAC2 según maduración



En conclusión el análisis de los quesos artesanales de cabra mediante técnicas moleculares basadas en el ADN bacteriano indicó que la microbiota láctica dominante de estos quesos está conformada por 4 géneros bacterianos: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*. No se encontraron diferencias importantes entre los quesos de valle y aquellos de cordillera, *Weissella* siendo el único género bacteriano específico de los quesos cordilleranos. No se observaron tampoco diferencias significativas en la frecuencia de estos 5 géneros bacterianos durante la maduración.

Aplicación de encuesta de cumplimiento de pre-requisitos (Anexo 1): Otra actividad complementaria al objetivo específico 1 que surgió fue la necesidad de obtener información acerca del nivel productivo de cada una de las empresas involucradas en el proyecto. Un primer análisis arrojó un nivel de cumplimiento promedio de un 54%, pero además se pudo observar que existían diferencias significativas en cuanto al nivel de cada una de éstas plantas, por lo que la información recopilada necesitó de un mayor análisis para realizar un ranking de las empresas. El Figura 10 muestra el resultado general

Figura 10. Nivel de cumplimiento promedio de las queserías participantes en el estudio



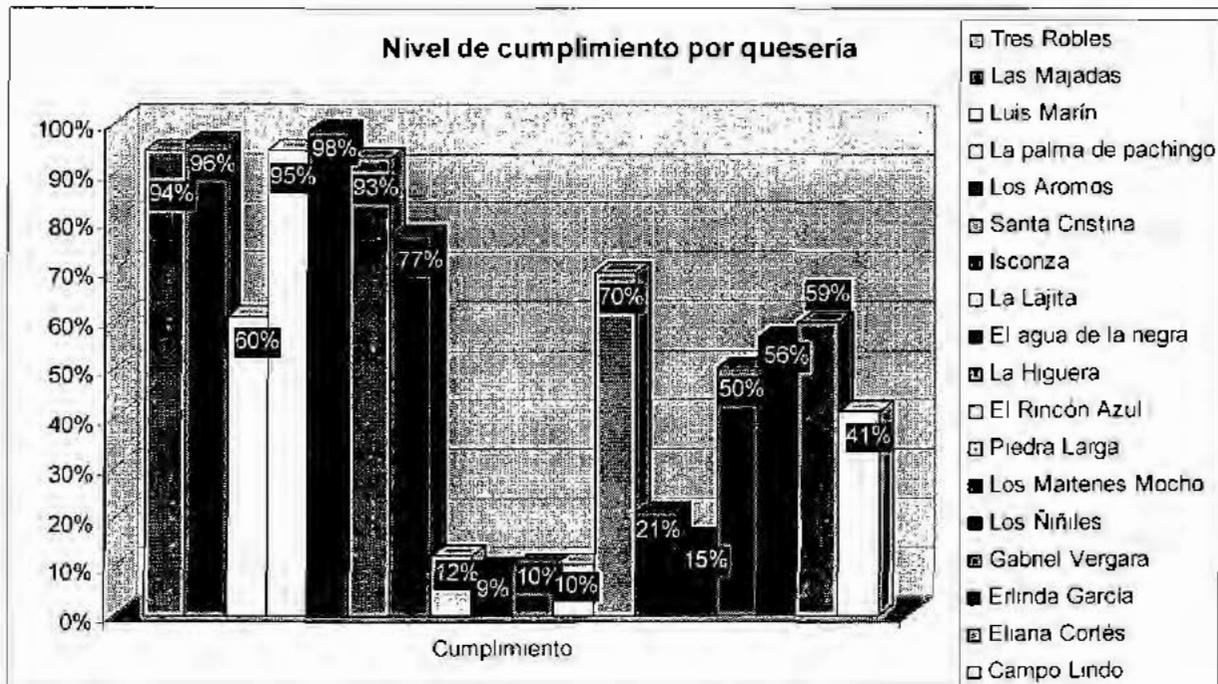
Conforme a este análisis las plantas queseras se clasificaron en tres niveles:

- Nivel 1: $\geq 75\%$ de cumplimiento. La planta comercializa en el mercado formal, con calidad semi-industrial
- Nivel 2: $\geq 50\%$ de cumplimiento. La planta comercializa en el mercado informal, pero su sistema productivo permitiría pasar al mercado formal incorporando algunos ajustes.
- Nivel 3: $< 50\%$ de cumplimiento. La planta posee bajo nivel tecnológico o bien se trata de productores trashumantes, por lo que se requiere una alta inversión para optar al mercado formal.

En este sentido se pudo observar que 6 plantas cumplían con el nivel 1 (Figura 11), 5 plantas con nivel 2 y 7 plantas con nivel 3, lo que permitió realizar la primera selección de la planta que sería la encargada de la primera etapa de producción de los quesos con fermentos locales seleccionados.



Figura 11. Nivel de cumplimiento de cada quesería participante en el estudio



Mediante los datos obtenidos, se realizaron visitas orientadas a las 6 plantas del nivel 1, donde se seleccionó a Las Majadas para realizar la producción de quesos con los 6 fermentos seleccionados, etapa que se encuentra en desarrollo en éstos momentos.

Objetivo Específico 2: Seleccionar cepas lácticas según sus propiedades tecnológicas respecto a actividades acidificante, lipolítica y antibacteriana, y a la producción de exopolisacáridos y diacetilo.

Para cumplir este objetivo y dado que el número de cepas de bacterias lácticas superó al estimado (507 vs 360), se realizó un ranking de las cepas en cada una de las propiedades descritas, de manera de pre-seleccionar las mejores y dentro de éstas seleccionar las que poseían las mejores características individuales o bien que tuvieran más de una de las propiedades mencionadas. Los resultados obtenidos para cada actividad son:

1) Producción de diacetilo:

En la fase de screening se preseleccionaron cepas mediante la prueba de Voges-Proskauer, para luego cuantificar su producción. Se obtuvieron un total de 317 cepas positivas para esta propiedad. De estas se cuantificó mediante cromatografía gaseosa un total de 295 sobrenadantes donde los resultados fueron los que se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Screening de cepas productora de diacetilo

	Diacetilo/acetato de etilo	Nº de cepas
No-productoras	DA no detectable	133
Productoras bajas	DA<1	127
Productoras medianas	1<DA<5	29
Productoras altas	5<DA<10	4
Productoras muy alta	DA>10	2

Como resultado de esta actividad se obtuvo que 6 de los 295 sobrenadantes analizados presentaron altos niveles de diacetilo, por lo que podrían ser usados para la elaboración de quesos, ellas fueron:

- a) QF 10-1: 29,1 UA (Lactobacillus termófilo)
- b) QF 52-3: 13,5 UA (Streptococcus)
- c) QF 36-1: 9,4 (Streptococcus)
- d) QF 13-2: 9,2 (Lactobacillus termófilo)
- e) QF 26-1: 7,2 (Enterococcus)
- f) QF 15-2a: 6,2 (Enterococcus)

2) Actividad proteolítica:

Se detectaron 355/507 cepas con algún grado de actividad proteolítica en el ensayo en placa, las que posteriormente fueron cuantificadas mediante la técnica del O-phtadialdehído (OPA). De estas se obtuvieron 24 cepas con alta actividad, de las cuales se pre-seleccionaron 8 cepas que presentaron actividad proteolítica importante (resultados expresados en unidades de DO a 340 nm):

- a) QF 20-1a: 1,16 U (Lactococcus)
- b) QF 52-5b: 1,05 U (Lactococcus)
- c) QF 19-1b: 0,937 U (Streptococcus)
- d) QF 18-1: 0,658 U (Enterococcus)
- e) QF 99-2: 0,588 U (Streptococcus)
- f) QF 26-1: 0,470 U (Enterococcus)
- g) QF 64-A: 0,233 U (Enterococcus)
- h) QF 40-4a: 0,230 U Lactococcus

3) Actividad acidificante:

Las 507 cepas lácticas fueron cuantificadas pro titulación de la acidez total, ello permitió aislar 8 de ellas como potenciales participantes de los fermentos a utilizar. Las cepas con mayor actividad acidificante pertenecieron al genero *Lactobacillus*. Los resultados fueron expresados en grados Dornic (1ml NaOH 0.1 N neutraliza 10 mg de ácido láctico y equivale a 10 grados Dornic). Las cepas seleccionadas fueron:



- a) QF 12-3: 73 °Dornic (Lactobacillus termófilo)
- b) QF 97-1: 68 °Dornic (Lactobacillus mesófilo)
- c) QF 81-2: 68 °Dornic (Lactobacillus mesófilo)
- d) QF 60-1: 62 °Dornic (Lactobacillus mesófilo)
- e) QF 10-1: 60 °Dornic (Lactobacillus termófilo)
- f) QF 1-1: 52 °Dornic (Lactobacillus mesófilo)
- g) QF 95-5a: 42 °Dornic (Lactococcus)
- h) QF 55-2a: 32 °Dornic (Lactococcus)

4) Actividad antibacteriana:

La actividad antibacteriana (Anexo 3) se evaluó contra tres patógenos o cepas blanco como son *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Estas 2 últimas provenían de queso de cabra artesanal. La gran mayoría de las cepas aisladas excepto las cepas del género *Enterococcus* presentó actividad inhibitoria en contra las cepas blanco. Se obtuvieron 38 cepas con actividad consistente contra uno, dos o tres patógenos. En función de las que demostraron mayor actividad se seleccionó 10 cepas. A continuación se detalla la cepa indicando el patógeno contra el cual presentó actividad inhibitoria

- a) QF 10-6 (Lactobacillus termófilo): *E. coli – Salmonella – S. aureus*
- b) QF 13-4 (Lactobacillus termófilo): *E. coli – Salmonella – S. aureus*
- c) QF 96-2(Lactobacillus mesófilo): *E. coli – Salmonella – S. aureus*
- d) QF 89-2(Lactobacillus mesófilo): *E. coli – Salmonella – S. aureus*
- e) QF 83-1(Lactobacillus mesófilo): *E. coli – Salmonella – S. aureus*
- f) QF 92-5(Enterococcus): *S. aureus - Salmonella*
- g) QF 98-15 (Leuconostoc): *S. aureus - Salmonella*
- h) QF 10-1(Lactobacillus termófilo): *E. coli - Salmonella*
- i) QF 3-7^a (Lactococcus): *S. aureus*
- j) QF 12-5 (Enterococcus): *S. aureus*

5) Producción de Exopolisacaridos (EPS):

Las 507 cepas fueron evaluadas por pruebas de finlancia y tinción de cápsula, y en las positivas posteriormente se cuantificó espectroscópicamente la producción de exopolisacáridos (método de Dubois). Se obtuvieron 59 cepas con una producción mayor de 50 µg de exopolisacáridos (glucosa) /10⁹ UFC. De estas se seleccionó 10 cepas con niveles adecuados de producción, las que se detallan a continuación (resultados en µg/ml glucosa)

- a) QF 75-2 (Lactobacillus mesófilo): 390,02
- b) QF 60-1 (Lactobacillus mesófilo): 379,81
- c) QF 45-3 (Lactobacillus mesófilo): 378,9
- d) QF 90-4 (Lactobacillus mesófilo): 372,6
- e) QF 78-3 (Lactobacillus mesófilo): 341
- f) QF 16-2 (Lactobacillus termófilo): 172
- g) QF 13-4 (Lactobacillus termófilo): 145,06
- h) QF 26-2 (Enterococcus): 89,21



- i) QF 97-1 (Enterococcus): 88,65
- j) QF 39-A (Enterococcus): 56,69

6) Actividad lipolítica:

En el screening inicial realizado mediante crecimiento en agar M17 suplementado con 1 % de Tributirina, o aceite de oliva o crema de leche con rhodaminaB, se seleccionaron 109 cepas de bacterias lacticas con actividad lipolítica, en las que posteriormente se cuantificó esta propiedad mediante un ensayo de titulación de ácidos grasos libres. Se detectó 26 cepas con alta actividad (expresados en ml de gasto de NaOH 50 mM) y de ellas se seleccionó 16 cepas seleccionada como potenciales fermentos:

- a) QF 89-3 (Lactococcus): 49,7
- b) QF 37-1(Lactococcus): 45,7
- c) QF 68-7 (Lactococcus): 32,1
- d) QF 43- (Streptococcus): 27,5
- e) QF 52-A (Enterococcus): 20,2
- f) QF 29-2 (Streptococcus): 19,8
- g) QF 48-2 (Enterococcus): 19,2
- h) QF 48-1 (Enterococcus): 18,7
- i) QF 83-1 (Enterococcus): 18,7
- j) QF 21-B (Enterococcus): 18,5
- k) QF 90-2 (Enterococcus): 18,5
- l) QF 73-2b (Enterococcus): 18,3
- m) QF 87-1 (Streptococcus): 18
- n) QF 79-2 (Lactococcus): 12
- o) QF 71-4 (Lactococcus): 11,8
- p) QF 100-7 (Lactococcus): 11,7

En resumen de las 507 cepas evaluadas, 11 (2.2%) tuvieron una alta actividad acidificante, 26 (5.1%) una fuerte actividad lipolítica, 24 (4.7%) una alta actividad proteolítica, 6 (1.2%) fueron importantes productores de diacetilo, 59 (11.6%) mostraron altos niveles de EPS (>50µg/109bac) y 38 (7.5%) ejercieron un actividad bacteriana en contra de uno o más patógenos. Entre los generos que destacaron los Lactobacillus, principalmente mesófilos, mostraron la mayor actividad para las propiedades acidificante y producción de exopolisacarido.

Objetivo específico 3: Elaborar quesos experimentales en una quesería utilizando distintas mezclas de fermentos previamente seleccionados en base a sus propiedades tecnológicas.

Selección y producción de los fermentos.

En base a la información obtenida de la caracterización de las propiedades tecnológicas se realizó un cruce de datos que permitió identificar aquellas cepas que presentaron dos o más de éstas actividades, de forma de privilegiar su utilización en la elaboración de los fermentos a utilizar en la producción de queso. De esta pre-selección se eligieron 10 cepas incluyendo cepas termófilas y mesófilas para formular 6 fermentos que fueron utilizados en la elaboración de quesos a nivel piloto.

Las características de cada mezcla de fermentos fueron:

Mezcla N°1: Incluye a la mejor cepa de cada una de las propiedades tecnológicas probadas.

Mezcla N°2: Incluye una cepa acidificante y productora de EPS, una proteolítica y una productora de diacetilo.

Mezcla N°3: Incluye dos cepas acidificantes, una productora de diacetilo y una proteolítica y lipolítica.

Mezcla N°4: Incluye una cepa con actividad lipolítica, una proteolítica y una acidificante.

Mezcla N°5: Incluye una cepa con actividad lipolítica, una proteolítica, una acidificante y una EPS.

Mezcla N°6: Incluye una cepa con actividad lipolítica, una proteolítica una acidificante y una EPS en mayor proporción (1,5).

Las cepas que conformaron cada uno de los fermentos fueron:

Mezcla N° 1			
Código cepa	Género	Cantidad	Propiedad
QF 12-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	Acidificante
QF 10-1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	1	Diacetilo
QF 20-1A	<i>Lactobacillus pentosus</i>	1	Proteolítica
QF 60-1	<i>Lactobacillus brevis</i>	1	Exopolisacarido
QF 89-3	<i>Lactococcus lactis</i>	1	Lipolítica
QF 83-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	Antibacteriana



Mezcla N° 2			
Código cepa	Género	Cantidad	Propiedad
QF 60-1	<i>Lactobacillus brevis</i>	1	Exopolisacarido + Acidificante
QF 10-1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	1	Diacetilo
QF 52-5b	<i>Lactobacillus paracasei</i>	1	Proeolítica

Mezcla N° 3			
Código cepa	Género	Cantidad	Propiedad
QF 12-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	Acidificante
QF 81-2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	Acidificante
QF 52-3a	<i>Lactococcus lactis</i>	1	Diacetilo Proteolítica +
QF 18-1	<i>Enterococcus sp.</i>	1	Lipolítica

Mezcla N° 4			
Código cepa	Género	Cantidad	Propiedad
QF 89-3	<i>Lactococcus lactis</i>	1	Lipolítica
QF 20-1A	<i>Lactobacillus pentosus</i>	1	Proteolítica
QF 12-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	Acidificante

Mezcla N° 5			
Código cepa	Género	Cantidad	Propiedad
QF 89-3	<i>Lactococcus lactis</i>	1	Lipolítica
QF 20-1A	<i>Lactobacillus pentosus</i>	1	Proteolítica
QF 12-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	Acidificante
QF 60-1	<i>Lactobacillus brevis</i>	1	Exopolisacarido + Acidificante



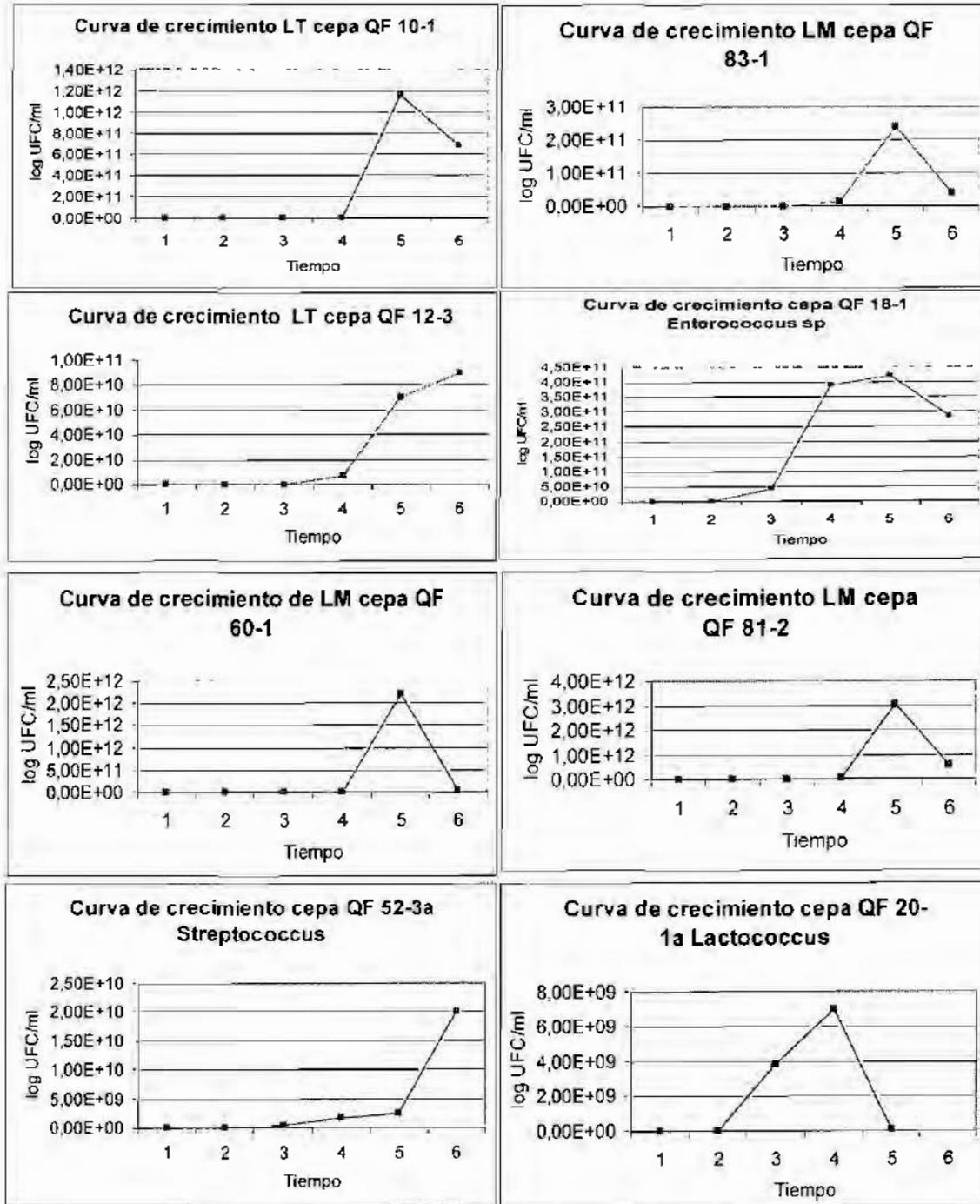
Mezcla N° 6			
Código cepa	Género	Cantidad	Propiedad
QF 89-3	<i>Lactococcus lactis</i>	1	Lipolítica
QF 20-1A	<i>Lactobacillus pentosus</i>	1	Proteolítica
QF 12-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	Acidificante
QF 60-1	<i>Lactobacillus brevis</i>	1,5	Exopolisacárido + Acidificante

Mezcla Control
Fermento comercial

Previo a la preparación de los fermentos se realizó curvas de crecimiento bacteriano en condiciones óptimas de desarrollo para cada una de las cepas seleccionadas. Ello permitió identificar la fase de crecimiento exponencial y los máximos recuentos alcanzados para estandarizar los inóculos finales. La figura 12 muestra las curvas de crecimiento típicas de 8 cepas. Los recuentos fueron determinados a las 0, 3, 6, 18, 24 y 29 horas (Tiempo 1, 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente). Todas las cepas estudiadas alcanzaron su máximo recuento (10^{10} UFC/ml) antes de las 18 horas de incubación a 37 ° en anaerobiosis, excepto *Streptococcus* sp.



Figura 12. Curvas de crecimiento de 8 cepas incluidas en el estudio





Elaboración de los quesos: Una vez obtenidos los fermentos, estos fueron enviados a la planta “Las Majadas” durante el mes de Abril, planta que fue elegida en función del cumplimiento de los requisitos antes descritos. El proceso de preparación de los quesos fue supervisado por el Sr. Juvenal Cortes y siguió el siguiente esquema (Anexo 4):

- 1) Pasteurización de la leche a 65° C por 30 minutos.
- 2) Adición de 4 gramos de cloruro de calcio (20 gramos por 100 litros de leche trabajada).
- 3) Reposo por 10 minutos.
- 4) Aplicación del fermento a 37°C.
- 5) Maduración de la leche 20 minutos.
- 6) Adición de cuajo. Formación de la cuajada 40 minutos.
- 7) Corte de la cuajada.
- 8) Reposo 5 minutos.
- 9) Primera agitación por 10 minutos.
- 10) Reposo 5 minutos.
- 11) Segunda agitación por 10 minutos.
- 12) Reposo 5 minutos.
- 13) Pre-prensado en el suero
- 14) Desuerado.
- 15) Amasado con adición de sal.
- 16) Moldeado.
- 17) Autoescurrido.
- 18) Oreo y salazón.
- 19) Maduración.

Esta etapa se cumplió exitosamente, en algunos quesos se observó una excesiva producción de gas durante el periodo de maduración, sin embargo este hallazgo no alteró la calidad del producto final.

Evaluación de la inocuidad de los quesos: Cumplido el tiempo de maduración los quesos fueron enviados al Laboratorio de Microbiología para análisis de control de calidad antes de realizar la evaluación sensorial. Los resultados indican que los parámetros *S. aureus* y de *Salmonella* cumplieron con la norma vigente en nuestro país (tabla 8) Sin embargo a excepción del queso control, todos los quesos mostraron recuentos de enterobacteriaceas un poco altos para este producto (niveles superiores a 10^3 UFC/g). Dado el tipo de microorganismo es probable que esta contaminación haya sido de tipo ambiental ya que fueron elaborados con leche pasteurizada.

Tabla 8: Evaluación de Parámetros microbiológicos según RSA en quesos de cabra elaborados con fermentos locales.

Queso	Mezcla de Fermentos	Enterobacteriaceas	<i>S. aureus</i>	Salmonella
1	M1	$1.8 \cdot 10^4$	<10	Ausente
2	M2	$1.3 \cdot 10^5$	<10	Ausente
3	M3	$4.7 \cdot 10^3$	<10	Ausente
4	M4	$5.8 \cdot 10^3$	<10	Ausente
5	M5	$9.2 \cdot 10^4$	<10	Ausente
6	M6	$2.3 \cdot 10^3$	<10	Ausente
7	CONTROL	<10	<10	Ausente

Evaluación sensorial de quesos experimentales: Los resultados del Panel de Evaluación Sensorial están descritos en el Anexo 5. En términos generales, la calidad sensorial de todas las muestras evaluadas fue superior a la registrada en los testigos. Los resultados indican que todos los quesos tienen buena aceptabilidad, sin encontrarse diferencias significativas entre ellos y dando cumplimiento al objetivo de producir un queso organolépticamente similar al artesanal a partir de leche pasteurizada. Debido a que no se encontraron diferencias significativas entre los quesos, se utilizaron dos criterios para la selección de las 2 mejores mezclas, el primero fue el orden de preferencias estimado por el panel y el segundo, que el menor número de cepas presentara la mayor cantidad de características tecnológicas (por ejemplo, una misma cepa con actividad antibacteriana y producción de diacetilo). Bajo este concepto, fueron seleccionados los fermentos 1 y 3.

Caracterización de los fermentos seleccionados: En esta etapa las cepas bacterianas que conformaron los fermentos seleccionados fueron identificadas a nivel de especie y adicionalmente se evaluó su susceptibilidad a los antibióticos y la presencia de plasmidios en las cepas eventualmente resistentes. Estos dos últimos ensayos no fueron incluidos en el proyecto original, pero nos pareció importante realizarlo ya que la evaluación de la transmisión de genes de resistencia a antibióticos constituye un criterio de exclusión para cepas que tienen como destino humanos. La identificación de las especies bacterianas de cada una de las cepas se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Identificación bioquímica de la especie bacteriana de los fermentos seleccionados

Fermentos	Identificación API
QF 12-3	<i>L. plantarum</i>
QF 10-1	<i>L. paracasei paracasei</i> 2
QF 20-1 ^a	<i>L. pentosus</i>
QF 60-1	<i>L. brevis</i>
QF 89-3	<i>L. lactis</i> 1
QF 83-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>
QF 52-5B	<i>Lactobacillus paracasei, spp paracasei</i> 1
QF 81-2	<i>L. plantarum</i> 1
QF 52-3 ^a	<i>Lactococcus lactis</i>
QF 18-1	<i>Enterococcus</i> grupo I



Detección de plasmidios. Inicialmente se evaluaron diferentes protocolos descritos para la extracción de plasmidios en bacterias Gram positivas. Los mejores resultados fueron obtenidos con el protocolo rapid-mini-prep reportado por O'Sullivan, basado en una extracción alcalina con una alta concentración de lisozima (30 mg/ml). En 2/10 cepas evaluadas se detectó la presencia de plasmidios, una de ellas presentó 3 bandas con masas entre 2000 y 4000 bp, la otra cepa dos bandas entre 3000 bp y 7000 bp.

Estudios de susceptibilidad a antibióticos. Los resultados mostraron que las 9 cepas de *Lactobacillus* fueron sensibles a los antibióticos ampicilina, amoxicilina y eritromicina. Se detectó resistencia a vancomicina (4/9), kanamicina (4/9), metronidazol (4/9), cefoxitina (4/9), penicilina (2/9), tetraciclina (2/9), clindamicina (1/9) y gentamicina (1/9). La única cepa de enterococcus fue sensible a todos los antibióticos probados.

El hallazgo de cepas resistentes a la vancomicina ha sido reportada por varios autores, sin embargo algunos sostienen que es una característica intrínseca de este género, aunque es actualmente discutida ya que se ha observado variabilidad para algunas especies de *Lactobacillus*. Para metronidazol y cefoxitina también se ha demostrado altos niveles de resistencia, concordando con los resultados informados aquí.

Son escasos los estudios que evalúan la susceptibilidad a los antibióticos en el Género *Lactobacillus* ya que en general son considerados comensales, sin embargo esto ha tenido que cambiar dado el amplio uso que estos microorganismos tienen como probióticos. En cualquier caso son muy escasos los artículos científicos que los asocian a cuadros infecciosos (endocarditis u otros).

Objetivo específico 5. Elaboración de quesos experimentales con los productores participantes:

Conforme a la metodología descrita anteriormente, en esta fase se prepararon quesos con leche de cabra pasteurizada con los dos fermentos seleccionados (1 y 3). En esta elaboración participaron 4 plantas, pero solo se consideraron los quesos provenientes de tres de ellas, ya que la calidad microbiológica de la cuarta quesería demostró recuentos inaceptables para su consumo (Tabla 10)

Tabla 10. Resultados microbiológicos de quesos artesanales preparados en plantas pilotos

Fecha	Fermento	Planta	Enterobacteriaceas	S. aureus	Salmonella	Microorganismos
16/11/06	M1	A	10 ³	< 3	Ausente	<i>Enterobacter</i> <i>Citrobacter</i>
16/11/06	M3	A	20x10	< 3	Ausente	
23/11/06	M1	B	19 x 10 ⁸	< 3	Ausente	<i>E. coli</i> <i>Klebsiella</i> <i>Enterobacter</i>
23/11/06	M3	B	34 x 10 ⁸	3 Positivo	Ausente	<i>E. coli</i> <i>Klebsiella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Serratia</i>
29/11/06	M1	C	43 x 10 ³	< 3	Ausente	<i>Klebsiella</i> <i>Serratia</i>
29/11/06	M3	C	52 x 10 ²	< 3	Ausente	<i>C. davisae</i> <i>Enterobacter</i> <i>Serratia</i>
05/12/06	M1	D	38 x 10	< 3	Ausente	<i>E. coli</i> <i>Serratia</i>
05/12/06	M3	D	10 x 10	< 3	Ausente	<i>Enterobacter</i> <i>Citrobacter</i>
20/11/06	Control		< 10	< 3	Ausente	

Evaluación sensorial de quesos experimentales: Los resultados del Panel de Evaluación Sensorial se encuentran detallados en el Anexo 6. Las conclusiones de este estudio indican que en todas las muestras evaluadas la calidad sensorial fue buena, al igual que la aceptabilidad. En esta ocasión la muestra control presentó mejor aceptabilidad que el resto de las muestras, pero sin alcanzar significancia estadística. Esto pudo deberse al tamaño de los quesos, menor de 500 gr, en comparación a los preparados en el primer estudio piloto, en donde se elaboraron quesos de aproximadamente 2,5 kg. Pensamos que esta variable hizo que este producto sufriera mayor deshidratación (a los 30 días de maduración) que el testigo. Esta situación se generó por la baja disponibilidad de leche en esta última etapa. Aún así los quesos mostraron buena apariencia, aroma específico del producto y sabor típico y agradable.

Objetivo específico 6. Capacitación del personal de las queserías en higiene personal, buenas prácticas y el correcto uso de los fermentos locales en la elaboración de queso de cabra.

En las tres capacitaciones realizadas durante la ejecución del proyecto se apreció gran interés de los participantes en los temas revisados (Buenas Prácticas Agrícolas y de Manufactura, Higiene e inocuidad y peligros biológicos). Los participantes tuvieron la oportunidad de conocer conceptos nuevos y adquirir conocimientos para el control de peligros. En el proyecto no se contempló una evaluación de las capacitaciones, pero se incluyó una encuesta para evaluar el cumplimiento de prerrequisitos por parte de los productores con participación directa en el estudio. Estos resultados sirvieron de base para definir los contenidos del segundo curso de capacitación que se desarrolló

en el mes de octubre de 2005. La tercera y última capacitación, se llevó a cabo en el mes de enero 2007, en Ovalle y en ella se entregaron conceptos microbiológicos a los productores y se entregó los resultados de su participación en el proyecto (microbiológicos y de elaboración de quesos).

Respecto a la capacitación en el uso de los fermentos esta se realizó solo con el personal de las plantas que elaboraron los quesos experimentales, adicionalmente en cada ocasión se les entregó un instructivo (Anexo 7). No se efectuó una capacitación masiva en el uso de fermentos ya que, debido a que no se encontraron empresas dedicadas a la producción de fermentos, no se llegó a un formato comercial del producto.

Objetivo específico 7. Evaluar comparativamente la producción de quesos de cabra en base a los fermentos seleccionados y un fermento comercial disponible

En todas las preparaciones de quesos experimentales se preparó un queso control con el fermento comercial MA 16 que incluía las cepas *Streptococcus lactis* y *Streptococcus cremoris*. Como se mencionó, los quesos preparados con los fermentos experimentales en la evaluación sensorial superaron en su score al queso control y no tuvieron diferencias significativas con los quesos artesanales.

Objetivos específico 8: Gestionar contactos con empresas nacionales y/o internacionales que posean tecnología o la intención de producir en forma comercial los fermentos

En nuestro país no existen empresas que se dediquen a la producción de fermentos comerciales, además, en el País no existe infraestructura para desarrollar estos fermentos en forma comercial. En este sentido, sería importante realizar una evaluación de la factibilidad de instalar una planta piloto en la IV Región, que pueda producir los fermentos en un volumen creciente en el tiempo.

Por otro lado, dados los buenos resultados obtenidos en la elaboración de los quesos con las mezclas seleccionadas, ya se dio inicio a los trámites de patentamiento de dichos fermentos. El proceso lo lleva a cabo el Sr. Javier Ramírez, Abogado de la Vicerrectora de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile, en conjunto con los Investigadores del Proyecto. En estos momentos se encuentra en etapa de revisión el patentamiento de una o las dos mezclas seleccionadas y una vez decidido esto, se postulará a fondos CORFO de patentamiento.

El proceso de patentamiento a seguir se discutió el día 31 de mayo de 2006 en una reunión en la sede de FIA, a la cual, además de los investigadores y el abogado Javier Ramirez, asistieron el Sr. Sebastián Ganderats y la abogada Carla Verdugo por parte de FIA.

5. Fichas técnicas y análisis económico

Con respecto a las fichas técnicas, no es posible entregar la información solicitada, dado que los detalles de la composición y elaboración de los fermentos para producir quesos, están en proceso de patentamiento, gestión que esta realizando el abogado Sr. Javier Ramírez en representación de la Universidad de Chile en conjunto con el FIA.

El análisis económico se debía efectuar tomando en cuenta que se contactaría empresas nacionales que produjeran el fermento de manera comercial. Al realizar estas gestiones y confirmar que en Chile no existe capacidad de producción de los fermentos, se debe plantear la posibilidad de efectuar un proyecto de implementación de una planta piloto para su elaboración comercial, lo que escapa a los alcances de este proyecto.

6. Impactos del proyecto

Conforme a las capacitaciones efectuadas, logramos que gran parte de los productores comprendieran los riesgos involucrados en la producción de queso de cabra y la responsabilidad que recae sobre ellos para controlar tales peligros. En muchos casos, los temas tratados eran desconocidos, lo que indica que las labores de capacitación y entrega de información utilizadas hasta la fecha no han sido todo lo efectivas que se esperaba.

La evaluación de las encuestas permitió conocer la situación actual de funcionamiento de las plantas queseras incluidas en el estudio y la falta de conocimientos y recursos. Debido a esto, la implementación de buenas prácticas agrícolas es un trabajo que requiere de asesoría continua y aporte de recursos económicos para que dichos productores estén mejor preparados para enfrentar las exigencias de los mercados actuales.

El proyecto permitió disponer de información relativa a la biodiversidad de la flora láctica de los quesos de cabra artesanal de esta región, lo cual constituye un primer paso para acceder a una denominación de origen.

En cuanto a la elaboración de quesos, los preparados con las mezclas de fermentos seleccionados fueron en su mayoría mejor evaluados que los quesos controles, tanto por el panel de evaluación sensorial como por los pequeños productores que participaron en su elaboración. Esto se traduce en que es posible obtener quesos de óptima calidad organoléptica que cumplan con los estándares de calidad e inocuidad requeridos por los mercados tanto nacional, como internacional.

Dado los buenos resultados obtenidos, los productores se encuentran muy motivados hacia la mejora continua y tienen interés en seguir participando y apoyando proyectos de este tipo. Un trabajo permanente en el tiempo y enfocado a las necesidades de capacitación de los productores en temas de higiene, les permitirá poder contar con productos inocuos y con esto acceder a mercados formales.

Los excelentes resultados del proyecto, con la obtención de numerosas cepas con características deseables, nos han motivado a iniciar el proceso de patentamiento de la 2 mezclas de fermentos seleccionadas, lo que se encuentra en etapa de estudio por parte del abogado de la Universidad de Chile, Sr. Javier Ramírez. En una segunda etapa se optará a fondos propios de la Universidad y de Corfo para realizar un patentamiento en conjunto con FIA.

Desde el punto de vista económico el empleo de estos fermentos deberá significar una disminución en los costos que hoy pagan por el producto importado.

Por último, aunque falta el desarrollo comercial de los fermentos, esperamos que su uso por parte de los pequeños productores de queso de cabra de la IV Región, los impulse en su meta de alcanzar mercados formales y de mejores precios para sus quesos.



7. Problemas enfrentados durante la ejecución del proyecto

• Técnicos

Durante el mes de abril de 2005, las instalaciones eléctricas del INTA sufrieron un alza de voltaje que se tradujo en la pérdida de equipos tanto en el laboratorio (incubadores, freezer) como en las oficinas (impresoras, computadores). El mayor problema para el proyecto fue la pérdida de un freezer de -83°C , donde se encontraban las cepas de bacterias lácticas aisladas hasta esa fecha. Los cultivos debieron ser recuperados y almacenados en otros freezers, aunque se registró una pérdida de un 5% de las cepas. Debido al alto costo de reparación (sobre \$1 millón), el equipo fue dado de baja y los cultivos fueron trasladados a equipos de -20°C .

Durante la primera etapa del proceso de preparación de los quesos, se controlaron los parámetros directamente asociados a la adición de los fermentos, pero no se puso mayor atención en labores propias del sistema productivo del queso de cabra. Debido a esto, algunos de los quesos elaborados tenían un exceso de sal y una parte importante de ellos presentaron niveles de enterobacterias mayores a los permitidos por el Reglamento Sanitario de los Alimentos ($<10^3$). Por esta razón, se repitió parte de esta labor mediante la preparación de nuevas mezclas de fermentos (3) y elaboración de nuevo batch de quesos. Con esta actividad (no contemplada en el proyecto original) se espera disminuir factores externos, como el salado del queso, en los análisis organolépticos restantes.

• Administrativos

Durante el desarrollo del proyecto hubo problemas permanentes con las rendiciones de cuentas por parte de la Universidad Tecnológica Metropolitana (UTEM), lo que dificultó la elaboración de los informes financieros en los periodos establecidos. Los principales problemas son la entrega de documentos incompletos y erróneos, lo que retrasó el sistema de contabilidad.

La Asistente Técnico Srta. Sandra Cofre Avendaño que trabajaba con el Prof. Martín Gotteland en el marco del proyecto FIA presentó su dimisión a principios de junio y fue remplazada por la Ingeniera en Alimentos Srta. Natalia Vega.

La Asistente Técnico Srta. María José del Valle que trabajaba con el Prof. Gustavo Faúndez en el marco del proyecto FIA presentó su dimisión el 31 de marzo de 2005 y fue remplazada por el Sr. Issa Cazor, estudiante de la Carrera de Ingeniera en Alimentos.

Todos estos reemplazos fueron comunicados y aprobados por FIA.

8. Difusión de los resultados

Ceremonia de lanzamiento

- Tipo de actividad realizada y objetivo principal: Ceremonia de Lanzamiento del proyecto (Anexo 8)
- Fecha y lugar de realización: Agosto 2005, La Serena, IV Región Chile
- Temas tratados o exposiciones realizadas
 - Presentación del proyecto ante autoridades locales y productores de la IV Región.
- Destinatarios de la actividad: Comunidad y productores de queso de cabra de la IV Región
- Identificación de los expositores:
 - Pedro Hernández, SEREMI IV Región
 - Sebastián Ganderats, Responsable Proyecto (FIA)
 - Guillermo Figueroa, Coordinador general del proyecto (INTA, Universidad de Chile)
- Características: Actividad que contó con la asistencia de los productores participantes en el proyecto, autoridades regionales, medios de comunicación locales y comunidad en general.
- Resumen de la actividad:

Objetivo: Dar a conocer el proyecto y sus objetivos ante la comunidad de la IV Región, así como el compromiso y respaldo de FIA y las autoridades locales a la realización del proyecto.

Conclusiones: La actividad contó con una gran asistencia por parte de productores de queso de cabra de la IV Región, quienes plantearon sus inquietudes ante los requerimientos establecidos por el proyecto. Además destacaron la importancia que tienen iniciativas de esta índole sobre la producción de queso y como consecuencia, sobre la economía de la Región.

Capacitaciones:

Taller de capacitación N°1 (Anexo 9)

- Tipo de actividad realizada y objetivo principal: Capacitación de Productores Participantes en el Proyecto en Inocuidad de alimentos (BPA y BPM)
- Fecha y lugar de realización: Agosto 2005, La Serena, IV Región Chile
- Temas tratados o exposiciones realizadas
 - Aseguramiento de la inocuidad en la producción caprina.
- Destinatarios de la actividad: Productores de queso de cabra de la IV Región
- Identificación de los expositores:
 - Álvaro Figueroa, Ingeniero Agrónomo con jornada parcial en el proyecto, INTA, Universidad de Chile
- Características: Se trató de una actividad centrada en los productores de queso de cabra de la IV Región involucrados directamente en el proyecto, pero que permaneció abierta a todos los productores interesados.



- Resumen de la actividad:

Objetivo: realizar una capacitación inicial de los productores participantes en el estudio en temas de calidad e inocuidad de alimentos, con énfasis en Buenas Prácticas Agrícolas y de Manufactura en la producción de quesos artesanales.

Conclusiones: Los participantes presentaron sus inquietudes y plantearon su desconocimiento y preocupación frente a los resultados obtenidos en muestras de sus productos, asimismo se mostraron interesados en participar de la encuesta y de futuras capacitaciones que les permitan mejorar sus condiciones de trabajo y con esto entregar productos más sanos y seguros. Muchos de ellos tienen real interés en comercializar sus productos a través de canales formales, por lo que el cumplimiento de las exigencias establecidas en el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA) es prioritaria para el desarrollo de su actividad.

Taller de capacitación N°2 (Anexo 10)

- Tipo de actividad realizada y objetivo principal: Segunda Capacitación de Productores Participantes en el Proyecto en Inocuidad del queso de cabra
- Fecha y lugar de realización: Diciembre 2005, Ovalle, IV Región Chile
- Temas tratados o exposiciones realizadas
 - Inocuidad en la elaboración del queso de cabra.
 - Principales peligros de contaminación y métodos de control.
- Destinatarios de la actividad: Productores de queso de cabra de la IV Región participantes en el estudio
- Identificación de los expositores:
 - Guillermo Figueroa (INTA). Jefe de proyecto.
 - Álvaro Figueroa (INTA), Ingeniero Agrónomo con jornada parcial en el proyecto.
- Características: Se trató de una actividad centrada en los productores de queso de cabra de la IV Región involucrados directamente en el proyecto.
- Resumen de la actividad:

Objetivo: Realizar una segunda capacitación a los productores participantes en el proyecto en temas relacionados a la inocuidad del producto y peligros relacionados.

Conclusiones: Aunque debido a la fecha de realización de la capacitación (diciembre) hubo un importante número de productores que no pudieron asistir, se estima que se lograron los objetivos establecidos, ya que los participantes presentaron sus inquietudes respecto de los temas tratados y otros, tales como la falta de continuidad de los proyectos financiados con fondos estatales. El interés de participar en las etapas posteriores del proyecto es manifiesto por parte de los productores y su asistencia fue considerada en la selección de la quesería para la segunda etapa.

Taller de capacitación N°3

- Tipo de actividad realizada y objetivo principal: Tercera Capacitación de Productores Participantes en el Proyecto en Inocuidad del queso de cabra
- Fecha y lugar de realización: Enero 2007, Ovalle, IV Región Chile
- Temas tratados o exposiciones realizadas
 - Peligro microbiológicos en la producción caprina.
- Destinatarios de la actividad: Productores de queso de cabra de la IV Región participantes en el estudio
- Identificación de los expositores:
 - Guillermo Figueroa (INTA). Jefe de proyecto.
 - Álvaro Figueroa (INTA), Ingeniero Agrónomo con jornada parcial en el proyecto.
- Características: Se trató de una actividad centrada en los productores de queso de cabra de la IV Región involucrados directamente en el proyecto.
- Resumen de la actividad:

Objetivo: Realizar la tercera capacitación y entrega de resultados microbiológicos a los productores participantes en el proyecto. En esta oportunidad se entregó información sobre los principales patógenos involucrados en la contaminación de los quesos, las vías de contaminación y formas de control.

Conclusiones: Los productores asistentes presentaron sus inquietudes y con ello se generó un debate que fue de gran utilidad para evitar problemas futuros. Al interiorizarnos más sobre la realidad del proceso productivo y los problemas determinados en los análisis microbiológicos, se generaron planteamientos en base a ejemplos aplicados al rubro, por lo que en nivel de entendimiento fue mayor al de capacitaciones anteriores.

Presentaciones a congresos

Presentación a XXVII Congreso Chileno de Microbiología (Anexo 11)

- Fecha y lugar de realización: Octubre 2005, Pucón, Chile
- Tems tratados o exposiciones realizadas
 1. Propiedades tecnológicas de Lactobacillus sp. aislados de leche y queso de cabra.
 2. Propiedades tecnológicas de cepas de Enterococcus aislados de quesos de cabra artesanal
- Destinatarios de la actividad: Comunidad científica y profesionales del área
- Identificación de los expositores:
 - Guillermo Figueroa, INTA – Universidad de Chile (1)
 - Miriam Troncoso, INTA – Universidad de Chile (2)

Presentación a XXVIII Congreso Latinoamericano de Microbiología (Anexo 12)

- Fecha y lugar de realización: Octubre 2006, Pucón, Chile
- Temas tratados o exposiciones realizadas
 1. Deficiente calidad microbiológica de los quesos de cabra artesanales de la IV región
 2. Buenas prácticas en productores de quesos de cabra artesanal de la IV región
 3. Evolución de microbiota láctica durante la maduración de queso de cabra artesanal
 4. Caracterización de las propiedades tecnológicas de bacterias lácticas aisladas de quesos artesanales de cabra
 5. Descripción mediante PCR-TTGE de la microbiota láctica de quesos artesanales de cabra
- Identificación de los expositores:
 - Álvaro Figueroa, INTA – Universidad de Chile (1-2)
 - Patricia Rivas, INTA – Universidad de Chile (3)
 - Gustavo Faúndez, UTEM (4)
 - Yael Codriansky, INTA (5)

Ceremonia de Clausura

- Tipo de actividad realizada y objetivo principal: Ceremonia de Clausura del proyecto
- Fecha y lugar de realización: Enero 2007, La Serena, IV Región Chile
- Temas tratados o exposiciones realizadas
 - Presentación de los resultados del proyecto ante autoridades locales, Encargados de FIA y productores de la IV Región.
- Identificación de los expositores:
 - Guillermo Figueroa, Coordinador general del proyecto. INTA, Universidad de Chile
 - Patricio Navarro, Director de INPROA
 - Germán Araya, Director Subrogante, INDAP IV Región.
 - Hugo Rojas, Director del Programa Caprino, INDAP IV Región.
 - Mauricio Cañoles, Jefe Unidad de Estudios y Proyectos, FIA
- Características: La actividad contó además con la asistencia del Sr. Sebastián Ganderats (FIA), Álvaro Figueroa (INTA), productores participantes en el proyecto y comunidad en general.
- Resumen de la actividad:

Objetivo: Dar a conocer los resultados finales del proyecto, sus alcances y sus proyecciones futuras que aseguren la utilización de los resultados.

Conclusiones: La actividad logró el objetivo de entregar los resultados frente a los productores de la IV Región y reunió a autoridades que pueden entregar continuidad a la labor iniciada en la Región.

9. Conclusiones y recomendaciones

- La evaluación de la calidad microbiológica de los quesos experimentales de leche de cabra mostró que un porcentaje importante de éstos, a pesar de la pasteurización, no cumplen con los parámetros establecidos por el Reglamento Sanitario de los Alimentos. Esto confirma deficiencias de las condiciones de higiene durante su elaboración y enfatiza la necesidad de capacitación continua orientada a las Buenas prácticas de Higiene y de Manufactura a los productores artesanales.
- La incorporación al proyecto de un mayor número de productores permitió obtener un mayor número de cepas, disponiendo así de un universo representativo y con mayor diversidad de las cepas disponibles. Al total se logró aislar 507 cepas lácticas perteneciendo a los generos *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. Luego se caracterizó un pool de cepas destacables por sus actividades acidificantes, proteasicas, lipasicas, antibacterianas y productoras de diacetilo o de exopolisacarido. Estas cepas podrían además, ser estudiadas en el futuro en cuanto a diversos aspectos, como por ejemplo en su capacidad probiótica.
- Como resultado concreto del proyecto, se logró obtener dos mezclas de fermentos que fueron utilizadas con éxito para la elaboración de quesos, siendo bien evaluados tanto por productores como por el panel de evaluación sensorial.
- El éxito de estas dos mezclas de fermentos sugiera que tienen alta potencialidad de ser comercializados, por lo que se dio inicio al proceso de su patentamiento.
- En Chile no existe en la actualidad la capacidad de producción de fermentos a escala semi industrial o industrial, lo que dificulta el desarrollo futuro de los fermentos y su accesibilidad por parte de los productores de queso.
- Si se consideran los puntos antes descritos, es recomendable continuar la labor iniciada a través de la capacitación continua de los productores, efectuar los estudios e inversiones necesarias que permitan la producción del fermento a escala comercial y efectuar nuevas investigaciones que permitan el desarrollo de productos nuevos de alta calidad e inocuidad y con mayor valor agregado, necesarios para el desarrollo del sector.



10. Otros aspectos de Interés

La ejecución del presente proyecto permitió la formación de recursos humanos, es decir, financió los proyectos de tesis de tres alumnos de pregrado, entre los que se incluyen dos futuros Ingenieros en Industria Alimentaria y un Ingeniero en Biotecnología Molecular, cuyos resúmenes de tesis se adjuntan en el Anexo 13. Las tres tesis se encuentran finalizadas y en etapa de revisión por parte de las comisiones académicas respectivas.

11. ANEXOS

ANEXO 1: Ficha datos personales

FICHA REPRESENTANTE(S) LEGAL(ES)

Agente Postulante

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Representante Legal del Agente Postulante		
Nombres	Fernando		
Apellido Paterno	Vio		
Apellido Materno	Del Río		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA)		
RUT de la Organización	60.910.000-1		
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Director		
Dirección (laboral)	El Líbano 5524		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Macul		
Fono	9781411		
Fax	2214030		
Celular	-		
Email	fvio@inta.cl		
Web	www.inta.cl		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

(A), (B), (C). Ver notas al final de este anexo

Agentes asociados

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Representante Legal del Agente Asociado		
Nombres	Miguel		
Apellido Paterno	Avendaño		
Apellido Materno	Berrios		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Universidad Tecnológica Metropolitana (UTEM)		
RUT de la Organización	70729100-1		
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla	Rector		
Dirección (laboral)	Dieciocho 161		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	562 6964123		
Fax	562 6981311		
Celular	-		
Email	rectoria_casacentral@utem.cl		
Web	www.utem.cl		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Representante Legal del Agente Asociado		
Nombres	Rolando Arturo		
Apellido Paterno	Michea		
Apellido Materno	Mundana		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Instituto Nacional de Promoción Agraria (INPROA)		
RUT de la Organización	70.008.570-8		
Tipo de Organización	Pública	<input type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla	SubDirector		
Dirección (laboral)	Federico Froebel 1676,		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Providencia		
Fono	2252720		
Fax	2050318		
Celular	-		
Email	r.michea@inproa.cl		
Web	www.inproa.cl		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

FICHA COORDINADORES Y EQUIPO TÉCNICO

(Esta ficha debe ser llenada tanto por el Coordinador Principal, Coordinador Alterno y cada uno de los integrantes del Equipo Técnico)



Tipo de actor en el Proyecto (A)	Coordinador Principal		
Nombres	Guillermo		
Apellido Paterno	Figueroa		
Apellido Materno	Gronemeyer		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA)		
RUT de la Organización	60.910.000-1		
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla	Profesor Asociado. Jefe de Laboratorio de Microbiología		
Profesión	Tecnólogo Médico		
Especialidad	Microbiología		
Dirección (laboral)	El Líbano 5524		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Macul		
Fono	9781474		
Fax	2214030		
Celular	98251264		
Email	gfigueroa@uchile.cl		
Web	www.inta.cl		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin Clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Coordinador Alterno		
Nombres	Martín		
Apellido Paterno	Gotteland		
Apellido Materno	-		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA)		
RUT de la Organización	60.910.000-1		
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla	Profesor Asociado. Unidad de Gastroenterología.		
Profesión	Fisiólogo		
Especialidad	Fisiología y fisiopatología		
Dirección (laboral)	El Líbano 5524		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Macul		
Fono	9781523		
Fax	2214030		
Celular	-		
Email	mgottela@inta.cl		
Web	www.inta.cl		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin Clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo Técnico		
Nombres	Gustavo Raúl		
Apellido Paterno	Faúndez		
Apellido Materno	Zamora		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Universidad Tecnológica Metropolitana (UTEM)		
RUT de la Organización	70.729.100-1		
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla x	Profesor Asociado		
Profesión	Bioquímico		
Especialidad	Microbiología		
Dirección (laboral)	Macul 1242		
Pais	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Macul		
Fono	7877123		
Fax	7877095		
Celular	90454777		
Email	gfaundez@utem.cl		
Web	www.utem.cl		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin Clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo Técnico		
Nombres	Miriam Rosa		
Apellido Paterno	Troncoso		
Apellido Materno	Herrera		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA)		
RUT de la Organización	60.910.000-1		
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Responsable Laboratorio, Diag. Microbiológico, Caract. Flora láctica.		
Profesión	Tecnólogo Médico		
Especialidad	Microbiología		
Dirección (laboral)	El Líbano 5524		
Pais	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Macul		
Fono	9781474		
Fax	2214030		
Celular	-		
Email	mtronco@inta.cl		
Web	www.inta.cl		
Género	Masculino	<input type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin Clasificar		

Tipo (C)	Profesional
----------	-------------

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo Técnico		
Nombres	Álvaro Francisco		
Apellido Paterno	Figueroa		
Apellido Materno	Olivares		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA)		
RUT de la Organización	60.910.000-1		
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla	Desarrollo de proyectos y docente en temas de Inocuidad Alimentaria (HACCP, BPA)		
Profesión	Ingeniero Agrónomo		
Especialidad	Sistemas de Gestión de Calidad e Inocuidad		
Dirección (laboral)	El Líbano 5524		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Macul		
Fono	9781474		
Fax	2214030		
Celular	-		
Email	afigueroa@inta.cl		
Web	www.inta.cl		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin Clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo Técnico		
Nombres	Patricia Carolina		
Apellido Paterno	Rivas		
Apellido Materno	Sánchez		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA)		
RUT de la Organización	60.910.000-1		
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla	Bioquímico		
Profesión	Bioquímico		
Especialidad	Microbiología		
Dirección (laboral)	El Líbano 5524		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Macul		
Fono	9781475		
Fax	2214030		
Celular	-		
Email	privas@inta.cl		
Web	www.inta.cl		



Género	Masculino	<input type="checkbox"/>	Femenino	<input checked="" type="checkbox"/>
Etnia (B)	Sin Clasificar			
Tipo (C)	Profesional			

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo Técnico			
Nombres	Rolando			
Apellido Paterno	Michea			
Apellido Materno	Mundaca			
RUT Personal				
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Instituto Nacional de Promoción Agraria (INPROA)			
RUT de la Organización	70.008.570-8			
Tipo de Organización	Pública	<input type="checkbox"/>	Privada	<input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla	Subdirector			
Profesión	Economista Agrario			
Especialidad	Evaluación y seguimiento de costos de producción			
Dirección (laboral)	Federico Froebel 1676			
País	Chile			
Región	Metropolitana			
Ciudad o Comuna	Providencia			
Fono	2252720			
Fax	2050318			
Celular	-			
Email	r.michea@inproa.cl			
Web	www.inproa.cl			
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino	<input type="checkbox"/>
Etnia (B)	Sin Clasificar			
Tipo (C)	Profesional			

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo Técnico			
Nombres	Juvenal			
Apellido Paterno	Cortés			
Apellido Materno	Rojas			
RUT Personal				
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Instituto Nacional de Promoción Agraria (INPROA)			
RUT de la Organización	70.008.570-8			
Tipo de Organización	Pública	<input type="checkbox"/>	Privada	<input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla	Asesor IV Región			
Profesión	Técnico en Ganado Caprino y producción de quesos			
Especialidad	BPA caprino y producción de quesos de cabra			
Dirección (laboral)	Federico Froebel 1676			
País	Chile			
Región	Metropolitana			
Ciudad o Comuna	Providencia			
Fono	2252720			
Fax	2050318			
Celular	-			
Email	r.michea@inproa.cl			



Web	www.inproa.cl		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin Clasificar		
Tipo (C)	Técnico		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo Técnico		
Nombres	Víctor		
Apellido Paterno	Calderón		
Apellido Materno	Leiva		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Instituto Nacional de Promoción Agraria (INPROA)		
RUT de la Organización	70.008.570-8		
Tipo de Organización	Pública	<input type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Coordinador Regional		
Profesión	Ingeniero en Ejecución Agrario		
Especialidad	Técnicas Pecuarias		
Dirección (laboral)	Federico Froebel 1676		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Providencia		
Fono	2252720		
Fax	2050318		
Celular	-		
Email	r.michea@inproa.cl		
Web	www.inproa.cl		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin Clasificar		
Tipo (C)	Técnico		

FICHA PARTICIPANTES O BENEFICIARIOS DIRECTOS

(Esta ficha debe ser llenada por cada uno de los beneficiarios directos o participantes vinculados al proyecto)

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario directo		
Nombres	Gustavo		
Apellido Paterno	Hernández		
Apellido Materno	Valdivia		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Quesos de Leche Santa Cristina		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	<input type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Representante Legal		
Profesión	-		
Especialidad	-		
Dirección (laboral)	6 km al este de quebrada seca y al oeste de Ovalle		
País	Chile		
Región	IV		
Ciudad o Comuna	Ovalle		
Fono	-		



Fax	-
Celular	-
Email	-
Web	-
Género	Masculino <input type="checkbox"/> x Femenino <input type="checkbox"/>
Etnia (B)	Sin clasificar
Tipo (C)	Productor individual pequeño

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario directo
Nombres	Luis
Apellido Paterno	Villar
Apellido Materno	
RUT Personal	
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Campo Lindo
RUT de la Organización	
Tipo de Organización	Pública <input type="checkbox"/> Privada <input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Representante Legal
Profesión	-
Especialidad	-
Dirección (laboral)	Cerrillos de Tamaya s/n
País	Chile
Región	IV
Ciudad o Comuna	Ovalle
Fono	-
Fax	-
Celular	-
Email	-
Web	-
Género	Masculino <input checked="" type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/>
Etnia (B)	Sin clasificar
Tipo (C)	Productor individual pequeño

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario directo
Nombres	Ismelda
Apellido Paterno	Contreras
Apellido Materno	Zarriente
RUT Personal	
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Quesería Isconza
RUT de la Organización	
Tipo de Organización	Pública <input type="checkbox"/> Privada <input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Representante Legal
Profesión	-
Especialidad	-
Dirección (laboral)	Bolsico Las Breas, Río Hurtado
País	Chile
Región	IV
Ciudad o Comuna	Río Hurtado
Fono	-



Fax	-		
Celular	-		
Email	-		
Web	-		
Género	Masculino	Femenino	<input checked="" type="checkbox"/>
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Productor individual pequeño		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario directo		
Nombres	Nicanor		
Apellido Paterno	Rojas		
Apellido Materno	Pasten		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Sociedad Tres Robles		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	Privada	<input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Representante Legal		
Profesión	-		
Especialidad	-		
Dirección (laboral)	Hurtado calle s/n		
País	Chile		
Región	IV		
Ciudad o Comuna	Ovalle		
Fono			
Fax	-		
Celular	-		
Email	-		
Web	-		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Productor individual pequeño		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario directo		
Nombres	María Soledad		
Apellido Paterno	Vicuña		
Apellido Materno	Baeza		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	La Palma de Pachingo		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	Privada	<input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Representante Legal		
Profesión	-		
Especialidad	-		
Dirección (laboral)	Pachingo		
País	Chile		
Región	IV		
Ciudad o Comuna	Ovalle		
Fono	-		

Fax	-		
Celular	-		
Email	-		
Web	-		
Género	Masculino	<input type="checkbox"/>	Femenino <input checked="" type="checkbox"/>
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Productor individual pequeño		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario directo		
Nombres	Juan		
Apellido Paterno	Ruilova		
Apellido Materno	Leal		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Las Majadas de Camarico		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Privada <input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Representante Legal		
Profesión	-		
Especialidad	-		
Dirección (laboral)	Las majadas de camarico		
País	Chile		
Región	IV		
Ciudad o Comuna	Punitaqui		
Fono	-		
Fax	-		
Celular	-		
Email	-		
Web	-		
Género	Masculino <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Femenino <input type="checkbox"/>
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Productor individual pequeño		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario directo		
Nombres	Hernaldo		
Apellido Paterno	Díaz		
Apellido Materno	Miranda		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Sociedad Agrícola Los Aromos		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Privada <input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Representante Legal		
Profesión	-		
Especialidad	-		
Dirección (laboral)	Campo Lindo		
País	Chile		
Región	IV		
Ciudad o Comuna	Ovalle		
Fono	-		



Fax	-		
Celular	-		
Email	-		
Web	-		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Productor individual pequeño		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario directo		
Nombres	Luis		
Apellido Paterno	Marin		
Apellido Materno			
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Sociedad Agrícola Los Aromos		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	<input type="checkbox"/>	Privada <input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Representante Legal		
Profesión	-		
Especialidad	-		
Dirección (laboral)	Quintallaco		
País	Chile		
Región	IV		
Ciudad o Comuna	Coquimbo		
Fono	-		
Fax	-		
Celular	-		
Email	-		
Web	-		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Productor individual pequeño		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario directo		
Nombres	Anibal		
Apellido Paterno	Torres		
Apellido Materno			
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	El Rincón Azul		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	<input type="checkbox"/>	Privada <input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Representante Legal		
Profesión	-		
Especialidad	-		
Dirección (laboral)	Almirante Latorre, Olla de Caldera		
País	Chile		
Región	IV		
Ciudad o Comuna	La Serena		



Fono	
Fax	-
Celular	-
Email	-
Web	-
Género	Masculino <input type="checkbox"/> x Femenino <input type="checkbox"/>
Etnia (B)	Sin clasificar
Tipo (C)	Productor individual pequeño

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario directo
Nombres	Luis
Apellido Paterno	Contreras
Apellido Materno	
RUT Personal	
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	La Higuera
RUT de la Organización	
Tipo de Organización	Pública <input type="checkbox"/> Privada <input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Representante Legal
Profesión	-
Especialidad	-
Dirección (laboral)	Olla de Caldera
País	Chile
Región	IV
Ciudad o Comuna	La Serena
Fono	-
Fax	-
Celular	-
Email	-
Web	-
Género	Masculino <input checked="" type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/>
Etnia (B)	Sin clasificar
Tipo (C)	Productor individual pequeño
Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario directo

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario directo
Nombres	Felipe
Apellido Paterno	Rivera
Apellido Materno	
RUT Personal	
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	El agua de la negra
RUT de la Organización	
Tipo de Organización	Pública <input type="checkbox"/> Privada <input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Representante Legal
Profesión	-
Especialidad	-
Dirección (laboral)	Olla de Caldera
País	Chile
Región	IV

Ciudad o Comuna	La Serena		
Fono	-		
Fax	-		
Celular	-		
Email	-		
Web	-		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Productor individual pequeño		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario directo		
Nombres	Lorenzo		
Apellido Paterno	Torres		
Apellido Materno			
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	La Lajita		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	<input type="checkbox"/>	Privada <input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Representante Legal		
Profesión	-		
Especialidad	-		
Dirección (laboral)	Almirante Latorre, Olla de Caldera		
País	Chile		
Región	IV		
Ciudad o Comuna	La Serena		
Fono	-		
Fax	-		
Celular	-		
Email	-		
Web	-		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Productor individual pequeño		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario directo		
Nombres	Aldo		
Apellido Paterno	Cortés		
Apellido Materno			
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Los Niños		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	<input type="checkbox"/>	Privada <input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Representante Legal		
Profesión	-		
Especialidad	-		
Dirección (laboral)	Almirante Latorre, Olla de Caldera		
País	Chile		



Región	IV		
Ciudad o Comuna	La Serena		
Fono	-		
Fax	-		
Celular	-		
Email	-		
Web	-		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Productor individual pequeño		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario directo		
Nombres	Gabriel		
Apellido Paterno	Vergara		
Apellido Materno			
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja			
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	<input type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella			
Profesión	-		
Especialidad	-		
Dirección (laboral)	Quintallaco		
País	Chile		
Región	IV		
Ciudad o Comuna	Coquimbo		
Fono	-		
Fax	-		
Celular	-		
Email	-		
Web	-		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Productor individual pequeño		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario directo		
Nombres	Erlinda		
Apellido Paterno	García		
Apellido Materno			
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja			
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	<input type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella			
Profesión	-		
Especialidad	-		
Dirección (laboral)	Quintallaco		
País	Chile		

Región	IV		
Ciudad o Comuna	Coquimbo		
Fono	1981214		
Fax	-		
Celular	-		
Email	-		
Web	-		
Género	Masculino	<input type="checkbox"/>	Femenino <input checked="" type="checkbox"/>
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Productor individual pequeño		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario directo		
Nombres	Eliana		
Apellido Paterno	Cortés		
Apellido Materno	Acuña		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja			
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	<input type="checkbox"/>	Privada <input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella			
Profesión	-		
Especialidad	-		
Dirección (laboral)	Quintalaco		
País	Chile		
Región	IV		
Ciudad o Comuna	Coquimbo		
Fono	51.240030		
Fax	-		
Celular	-		
Email	-		
Web	-		
Género	Masculino	<input type="checkbox"/>	Femenino <input checked="" type="checkbox"/>
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Productor individual pequeño		

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario directo		
Nombres	Rodolfo		
Apellido Paterno	Villar		
Apellido Materno			
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Piedra Larga		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	<input type="checkbox"/>	Privada <input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Persona Natural		
Profesión	-		
Especialidad	-		
Dirección (laboral)	El Espinal de Chalinga		
País	Chile		
Región	IV		



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA



Ciudad o Comuna	Ovalle
Fono	639542
Fax	-
Celular	-
Email	-
Web	-
Género	Masculino <input type="checkbox"/> x Femenino <input type="checkbox"/>
Etnia (B)	Sin clasificar
Tipo (C)	Productor individual pequeño

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario directo
Nombres	Augusto
Apellido Paterno	Robledo
Apellido Materno	
RUT Personal	
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Los Maitenes Mocho
RUT de la Organización	
Tipo de Organización	Pública <input type="checkbox"/> Privada <input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Persona Natural
Profesión	-
Especialidad	-
Dirección (laboral)	Almirante Latorre, Olla de Caldera
País	Chile
Región	IV
Ciudad o Comuna	La Serena
Fono	-
Fax	-
Celular	-
Email	-
Web	-
Género	Masculino <input checked="" type="checkbox"/> x Femenino <input type="checkbox"/>
Etnia (B)	Sin clasificar
Tipo (C)	Productor individual pequeño

ANTECEDENTES GLOBALES DE PARTICIPACIÓN DE PRODUCTORES

REGIÓN	TIPO PRODUCTOR	GÉNERO FEMENINO	GÉNERO MASCULINO	ETNIA (INDICAR SI CORRESPONDE)	TOTALES
IV	PRODUCTORES PEQUEÑOS	4	14		18
	PRODUCTORES MEDIANOS-GRANDES	X	X	X	X

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS DE PARTICIPACIÓN DE PRODUCTORES

NOMBRE	UBICACIÓN PREDIO			Superficie Hás	Fecha ingreso al proyecto
	Region	Comuna	Dirección Postal		
Gustavo Hernández (Sta Cristina)	IV	Ovalle	x		Enero 2005
Ismelda Contreras (Isconza)	IV	Río Hurtado	x		Enero 2005
Nicanor Rojas (Sociedad Tres Robles)	IV	Río Hurtado	x		Enero 2005
M ^a Soledad Vicuña (La Palma)	IV	Ovalle	x		Enero 2005
Juan Ruilova (Las Majadas)	IV	Ovalle	x		Enero 2005
Hernaldo Díaz (Soc. Agrícola Los Aromos)	IV	Ovalle	x		Enero 2005
Luis Villar (Campo Lindo)	IV	Ovalle	x		Enero 2005
Luis Marín	IV	Coquimbo	x		Enero 2005
Anibal Torres (El Rincón Azul)	IV	La Serena	x		Enero 2005
Luis Contreras (La higuera)	IV	La Serena	x		Enero 2005
Felipe Rivera (El Agua de la Negra)	IV	La Serena	x		Enero 2005
Lorenzo Torres (La Lajita)	IV	La Serena	x		Enero 2005
Aldo Cortés (Los Niñiles)	IV	La Serena	x		Enero 2005
Gabriel Vergara	IV	Coquimbo	x		Enero 2005
Erlinda García	IV	Coquimbo	x		Enero 2005
Eliana Cortés	IV	Coquimbo	x		Enero 2005
Rodolfo Villar (Piedra larga)	IV	Ovalle	x		Enero 2005
Augusto Robledo (Los Maitenes)	IV	La Serena	x		Enero 2005



ANEXO 2: Encuesta de evaluación de cumplimiento de Buenas Prácticas Agrícolas y de Manufactura.



Proyecto FIA-PI-C-2004-1-P-040

MEJORAMIENTO DE LA CALIDAD Y DIFERENCIACIÓN DE QUESOS DE GABRA ELABORADOS CON LECHE PASTEURIZADA MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE FERMENTOS LÁCTICOS LOCALES SELECCIONADOS

ANTECEDENTES PERSONALES

Nombre de la Lechería _____

Propietario: _____

RUT: _____

Localidad: _____

Comuna: _____

Provincia: _____

Teléfono: _____ Fax: _____ E-mail: _____

Número de trabajadores 1 _____ más de 1 _____

Si es más de uno, que función desempeña cada uno

1 _____

2 _____

3 _____

4 _____

Tipo de elaboración

1. Estabulada

2. Móvil

3. Producción en cordillera

4. Otro Especificar _____

Nombre del productor

Firma



REBAÑO Y ESTABLOS

ESPECIFICACIONES	OBSERVACIONES	
Superficie total		
Propia / arriendo / otro		
N° Animales	Hembras	
	Machos	
Raza		
Estado general observado		
Sanidad animal		
Asistencia de médico veterinario		
Plan de manejo sanitario de animales		
Inscrito en PABCO	SI / NO	por qué:

Ítem	Característica	Cumple		Observaciones
		SI	NO	
Establo	Dimensiones (1m2/animal)			
	Material de suelo			
	Tierra			
	Cemento			
	Sistema de ventilación (lucarna)			
	Alojamientos para animales			
	Comederos			
	Bebederos			
	Patio de ejercicios			
	Maternidad			
	Agua			
	Protección a T°			
	Cumplimiento		0	0



SALA DE ORDEÑA

Dimensiones:

m²

Capacidad:

animales/hr

Ítem	Cumple		Observaciones
	SI	NO	
Uso propio			
Sistema			
Manual			
Automatico (equipos de ordeña)			
Ubicación de la sala			
Aislamiento			
Olores del galpón			
Patio de ejercicios			
Sala de espera			
Corrales			
Galpones de alimento			
Agua potable			
Protección			
Temperatura			
precipitaciones			
Viento			
Enfriamiento y almacenamiento de leche			
Registros			
Cumplimiento	0	0	Cumpl (%) #iDIV/0!

HIGIENE

Ítem	Adecuado	Regular	Malo
Sala de ordeña (instalaciones)			
Piso			
Paredes			
Techos			
Ventanas			
Lavamanos			
Equipos (ordeñador automático)			
Utensilios (tambores, cucharones, etc)			
Manipulador			
Uso de ropa de trabajo			
Apreciación general			
Guantes			
Mascarilla			
Delantal			
Joyas			
Programa de limpieza			
Sala			
Equipos			
Registros			



Infraestructura planta productiva

Item	Cumple		Observaciones
	SI	NO	
Ubicación			
Luz			
Accesos asfaltados			
Agua potable (3 lt/lt leche)			
Cuenta con cerco			
Pediluvio			
	0	0	
Sala recepción			
Almacenamiento por origen			
Lugar de toma de muestras			
Estanque isotermico (T°)			
Zona sucia (lavado)			
Romana			
Registros			
	0	0	
Sala de Elaboración			
Filtración			
Pasteurización (65°/30 min)			
Enfriamiento			
Tina (inoculación, coagulado)			
Moldeado			
Prensado			
Registros			
Agitación y desuerado			
	0	0	
Sala de Lavado			
	0	0	
Cámara Maduración/Salado			
Sala controlada			
Temperatura			
Humedad			
Filtro de aire			
Estanterías de maduración			
Panel de control			
Termómetro			
Higrómetro			
Hermética y con control de T°			
Material aislante y lavable en...			
Estanterías de maduración			
Suelo			
Paredes			
Techo			
Puertas			
Existen cantos en paredes y techo			
Registros			
	0	0	
Sala de envasado/almacenaje			
Repisas			
Línea de embalaje			
Registros			
	0	0	



Servicios higiénicos			
Duchas			
Excusados			
Lavamanos			
Guardaropa			
Sector de cambio de ropa			
Sugerencia (H y M separado)			
Lavamanos plast/ferro enlozado/Ainox			
Conexión de agua PVC o PP			
	0	0	
Bodega de materiales			
Insumos (separados y rotulados)			
Estanterías y envases p/producto			
Registros			
	0	0	
Otros parámetros generales para toda la planta			
Malla mosquitera en ventanas			
Pintura antihonhos, lavable			
Techos herméticos			
Desagues de concreto o eternit			
Mat oxidable c/antiox y pintura bca			
Pisos			
Inclinación 1 a 2%			
Material lavable			
Sistema de eliminación de basura			
Se encuentra alejado del sec. prod.			
Sistema de control de plagas			
Registros			
	0	0	

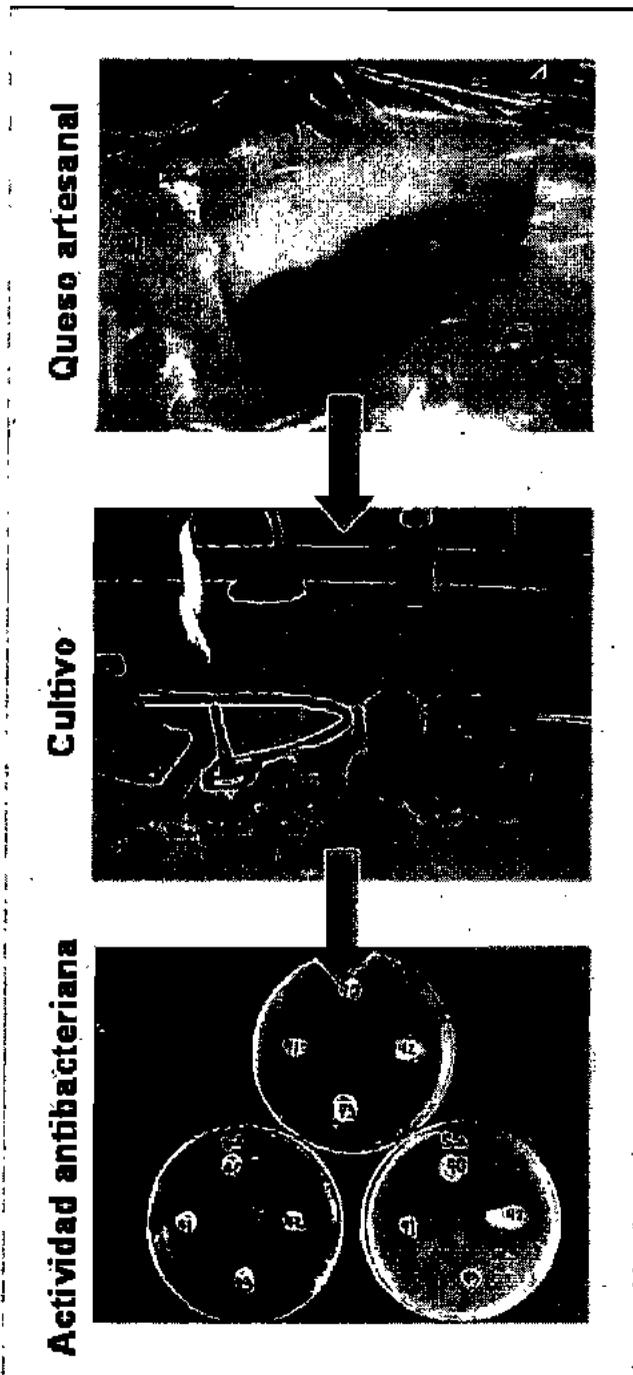
HIGIENE

Ítem	Adecuado	Regular	Malo
Sala de ordeña (instalaciones)			
Piso			
Paredes			
Techos			
Ventanas			
Lavamanos			
Equipos (ordeñador automático)			
Utensilios (tambores, cucharones, etc)			
Manipulador			
Uso de ropa de trabajo			
Apreciación general			
Guantes			
Mascarilla			
Delantal			
Joyas			
Programa de limpieza			
Sala			
Equipos			
Registros			

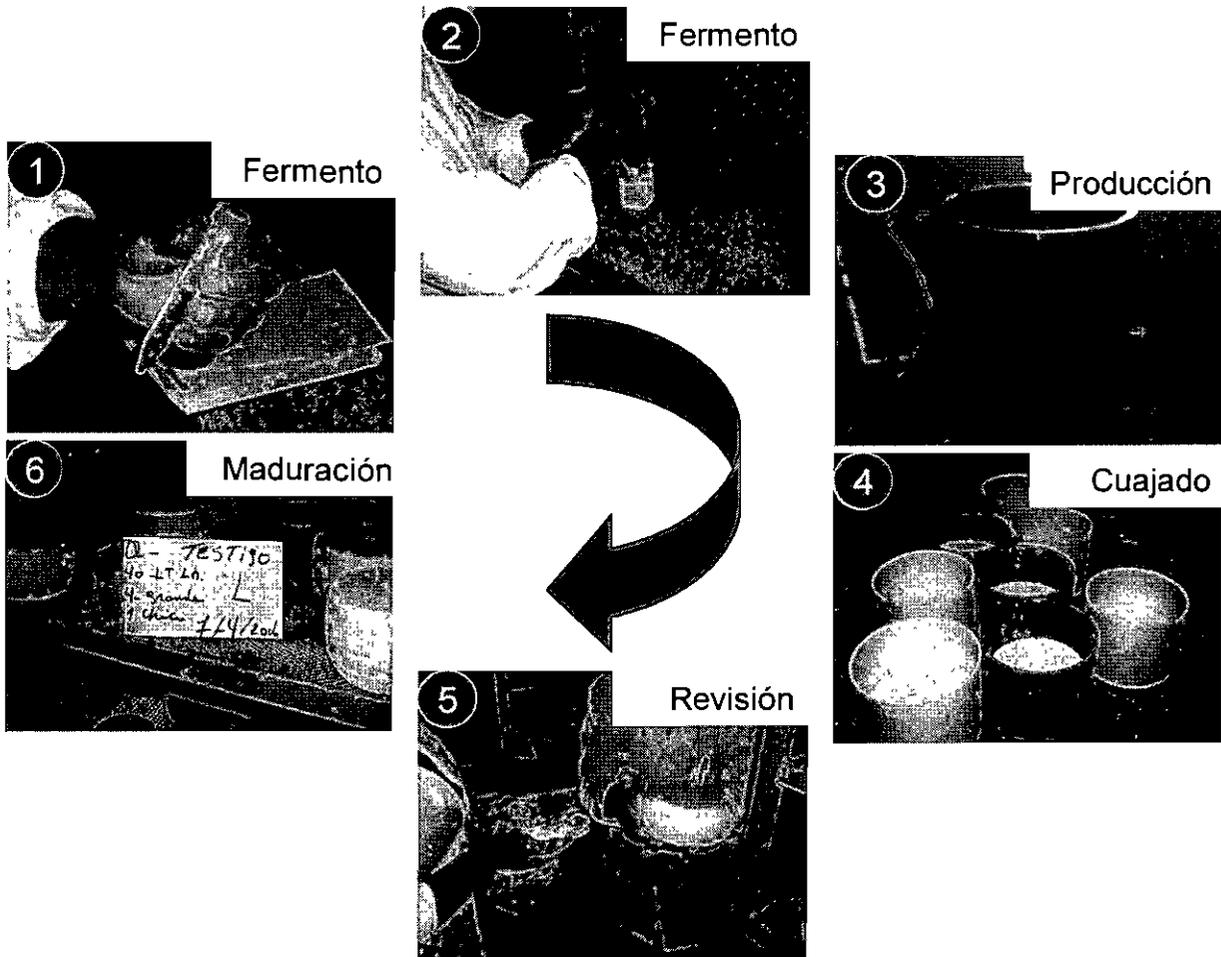
Control sobre la leche y envases

Ítem	Cumple		Observaciones
	SI	NO	
Procede del mismo lugar			
Se compra a otro productor			
El almacenamiento refrigerado			
T° de transporte es superior a 4°			
Se realizan análisis de			
Calidad			
Inocuidad			

ANEXO 3: Evaluación de propiedades tecnológicas en bacterias lácticas



ANEXO 4: Proceso de elaboración de quesos con fermentos lácticos seleccionados





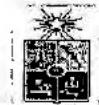
GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA



ANEXO 5: Resultados del panel de evaluación sensorial de 6 quesos experimentales.



Macul 5540
Castilla 138-11
Santiago - Chile
Fax : (56) 2 2214030
Phone. (56) 2 6781429
E-mail: izacaria@inta.cl



UNIVERSIDAD DE CHILE
INSTITUTO DE NUTRICION
Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS
Laboratorio de Evaluación Sensorial



Universidad de las Naciones
Unidas
Área Alimentos

Santiago, 29 de mayo de 2006

INFORME DE EVALUACIÓN SENSORIAL DE QUESOS DE CABRA

El presente informe contiene los resultados de la evaluación de calidad sensorial de siete muestras de queso de cabra.

Objetivo: Evaluar la calidad sensorial de las siete muestras de queso de cabra.

Metodología

Identificación de las muestras:

Las muestras de queso fueron codificadas de la siguiente forma:

Muestra A: QF 106 M3

Muestra B: QF105 M2

Muestra C: QF104 M1

Muestra D: QF110 Testigo

Muestra E: QF107 M4

Muestra F: QF109 M6

Muestra G: QF108 M5

Mesa Redonda

Previo a la realización de las sesiones individuales de evaluación de calidad sensorial se realizó una mesa redonda con todos los panelistas, con el objetivo de que los panelistas identifiquen las características sensoriales propias del queso de cabra, validen las pautas diseñadas para evaluar la calidad sensorial del queso de cabra, y conozcan el test de evaluación de calidad que se utilizó en las evaluaciones de estos productos. En esta sesión se presentó la muestra D correspondiente al testigo QF110.

Presentación de las muestras

Se realizaron 4 sesiones de evaluación de calidad sensorial en las cuales se dieron a degustar 2 muestras de queso y en la última sesión, una sola muestra.

Las muestras de queso fueron presentadas a cada panelista en pocillos individuales y codificadas con dígitos de tres números al azar. Tanto el orden de degustación de los productos como el orden de presentación a cada persona fue designado al azar.

Panelistas: La evaluación de calidad se realizó con un panel de 12 jueces entrenados pertenecientes al INTA.

Calidad organoléptica:

Se utilizó el test de valoración - descriptivo, con escala de Karlsruhe en amplitud de 9 puntos, en la cual 1 indica que el parámetro evaluado está muy disminuido y 9 que cumple con lo óptimo para el producto. Por ejemplo 1 para sabor significa: "Extraño, desagradable, malo" y 9 "característico del producto, agradable, específico".

Los parámetros medidos fueron: apariencia, aroma, sabor y textura. Se evaluó además la aceptabilidad empleando una escala hedónica de nueve puntos, en que 9 corresponde a "me gusta extremadamente" y 1 "me disgusta extremadamente".

Resultados

Calidad organoléptica

Tabla 1. Test de valoración de calidad de 7 muestras de queso de cabra*.

	Apariencia	Aroma	Sabor	Textura	Calidad total
A	8.0 ^{abc}	8.0 ^a	7.5 ^{abc}	7.8 ^a	7.8 ^a
B	8.0 ^{abc}	7.5 ^a	6.8 ^{ab}	7.6 ^a	7.4 ^a
C	8.2 ^{abc}	7.5 ^a	7.6 ^{abc}	7.9 ^a	7.7 ^a
D	7.7 ^{ab}	7.8 ^a	7.7 ^{abc}	7.1 ^a	7.5 ^a
E	8.2 ^{abc}	7.6 ^a	7.2 ^{abc}	7.1 ^a	7.5 ^a
F	8.3 ^{ac}	8.0 ^a	7.2 ^{abc}	7.5 ^a	7.7 ^a
G	8.3 ^{ac}	7.9 ^a	7.8 ^{ac}	7.7 ^a	7.9 ^a

* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas($p < 0.05$)

En la tabla 1 se presentan los valores promedios de los distintos parámetros evaluados y se observa lo siguiente:

Apariencia: Las muestras A, B, C, E, F y G presentaron para este atributo un valor sobre ocho que significa que la apariencia es "muy buena, atractiva, uniforme y característica del producto", no hay diferencias significativas entre ellas. En cambio la muestra D presentó un valor de 7.7, que significa que la apariencia es "buena, natural, uniforme y típica del producto", siendo esta diferencia estadísticamente significativa respecto de las muestras F y G ($p < 0.05$).

Aroma: Todas las muestras presentaron un aroma “bueno, característico del producto”, el rango de valores obtenidos para este atributo fluctuó entre 7.5 y 8.0; no hay diferencias significativas entre ellos. En las muestras A, B y E se percibió un aroma mas suave y típico a pesar que no hay diferencias significativas con el resto.

Sabor: En general el sabor fue evaluado como “bueno” (típico, suave, ligeramente ácido) con un rango de valores entre 6.8 a 7.8. La muestra B presentó el valor más bajo (6.8) el cual es estadísticamente diferente de la muestra G, que presentó el valor más alto. Las muestras A, C y E fueron percibidas por los panelistas un poco mas ácidas que el resto, por otra parte las muestras B, C y F se encontraron mas saladas

Textura: La textura fue evaluada entre “buena” y “muy buena” que corresponde a suave, firme, y típica del producto. No hay diferencias significativas entre las muestras. Se encontró una textura mas cremosa en las muestras A, B y E, mientras que la muestra D fue percibida como mas firme y dura.

Calidad Total: Para obtener este valor se ponderó los parámetros apariencia, aroma, sabor y textura en un 20, 30, 30, y 20% respectivamente. Se puede observar que todas las muestras tienen valores sobre 7.4, lo que corresponde a calidad sensorial grado 1, que significa que el producto es de buena calidad organoléptica.

Aceptabilidad: La aceptabilidad en todas las muestras fue buena, ya que se encontraron valores entre 6.9 y 7.8. Se observa una tendencia a una mejor aceptabilidad en la muestra G, A, C y D a pesar de que esta diferencia no es estadísticamente significativa.

Muestra	Aceptabilidad
A	7.7 ^a
B	6.9 ^a
C	7.5 ^a
D	7.3 ^a
E	6.9 ^a
F	6.9 ^a
G	7.8 ^a

Conclusiones

1. La calidad sensorial de todas las muestra evaluadas fue buena.
2. Los resultados de la aceptabilidad de los quesos evaluados indican que todos tienen buena aceptabilidad sin encontrarse diferencias significativas entre ellas.

ANEXO 6: Resultados del panel de evaluación sensorial de 2 quesos experimentales.



Macul 5540
Casilla 138-11
Santiago - Chile
Fax : (56) 2 2214030
Phone: (56) 2 6781429
E-mail: dgonzalez@inta.cl
izacana@inta.cl



UNIVERSIDAD DE CHILE
INSTITUTO DE NUTRICION
Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS
Laboratorio de Evaluación Sensorial



Universidad de las Naciones
Unidas
Área Alimentos

Santiago, 18 de diciembre de 2006

INFORME DE EVALUACIÓN SENSORIAL DE QUESOS DE CABRA

El presente informe contiene los resultados de la evaluación de calidad sensorial de nueve muestras de queso de cabra de las cuales 3 corresponden a muestras controles.

Objetivo: Evaluar la calidad sensorial de nueve muestras de queso de cabra y comparar la calidad de las muestras experimentales con las muestras controles.

Metodología

Identificación de las muestras:

Las muestras de queso fueron codificadas de la siguiente forma:

- Muestra H: QF 124 – M3
- Muestra I: QF 125 – T (Control)
- Muestra J: QF 123 – M1
- Muestra K: QF 128
- Muestra L: QF 129
- Muestra M: QF Control
- Muestra N: QF Control
- Muestra O: QF 130
- Muestra P: QF 131

Presentación de las muestras

Se realizaron 3 sesiones de evaluación de calidad sensorial en las cuales se dieron a degustar 3 muestras de queso y cada caso dos correspondían a muestras del estudio y una a control.

Las muestras de queso fueron presentadas a cada panelista en pocillos individuales y codificadas con dígitos de tres números al azar. Tanto el orden de degustación de los productos como el orden de presentación a cada persona fue designado al azar.

Panelistas: La evaluación de calidad se realizó con un panel de 12 jueces entrenados pertenecientes al INTA.

Calidad organoléptica:

Se utilizó el test de valoración - descriptivo, con escala de Karlsruhe en amplitud de 9 puntos, en la cual 1 indica que el parámetro evaluado está muy disminuido y 9 que cumple con lo óptimo para el producto. Por ejemplo 1 para sabor significa: "Extraño, desagradable, malo" y 9 "característico del producto, agradable, específico".

Los parámetros medidos fueron: apariencia, aroma, sabor y textura. Se evaluó además la aceptabilidad empleando una escala hedónica de nueve puntos, en que 9 corresponde a "me gusta extremadamente" y 1 "me disgusta extremadamente".

Resultados

Calidad organoléptica

Tabla 1. Test de valoración de calidad de 12 muestras de queso de cabra*.

	Apariencia	Aroma	Sabor	Textura	Calidad total
H	8.0 ^a	7.5 ^{ab}	6.9 ^{ab}	7.3 ^a	7.4 ^{ab}
I	8.4 ^a	7.6 ^a	7.8 ^b	8.2 ^a	7.9 ^b
J	7.7 ^a	7.1 ^{ab}	6.4 ^a	6.8 ^b	7.0 ^a
K	7.2 ^b	6.7 ^b	6.3 ^a	6.8 ^b	6.9 ^a
L	7.6 ^a	7.0 ^{ab}	6.7 ^a	6.8 ^b	7.0 ^a
M	7.8 ^a	7.1 ^{ab}	7.1 ^{ab}	7.2 ^{ab}	7.3 ^{ab}
N	7.4 ^b	6.8 ^{ab}	7.3 ^{ab}	7.1 ^b	7.1 ^a
O	7.6 ^a	7.1 ^{ab}	6.6 ^a	6.8 ^b	7.0 ^a
P	7.3 ^b	7.3 ^{ab}	7.0 ^{ab}	7.3 ^{ab}	7.2 ^{ab}

* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

En la tabla 1 se presentan los valores promedios de los distintos parámetros evaluados y se observa lo siguiente:

Apariencia: La apariencia del producto en general fue bien evaluada, ya que los valores de todas las muestras analizadas, están sobre 7.0 que significa que la apariencia es "natural, uniforme y típica del producto". La mejor apariencia la obtuvo la muestra H e I, con valores de 8.0 y 8.4 respectivamente. Existen diferencia significativa en la apariencia entre la muestra I, y las muestras K, N y P. Sin embargo todas se ubican en una buena apariencia.

Aroma: La mayoría de las muestras evaluadas tiene un valor sobre 7.0, que indica que el aroma es "específico del producto". Sólo la muestra K y N tienen un valor ligeramente inferior a 7.0 (6.7 – 6.8), valor que significa "aún con aroma específico". Sólo en las muestras I es estadísticamente distinta de la muestra K.

Sabor: Los valores encontrados para sabor, van desde 6.3 (K) a 7.8 (I) que significan respectivamente “Aún con buen sabor” y “Típico, bueno, agradable”. La muestra I fue significativamente diferente de las muestras J, K, L y O.

Textura: La mejor textura la obtuvo la muestra I con un puntaje de 8.2 que significa “muy buena, típica, firme”, mientras que las muestras J, K, L y O alcanzaron un valor de 6.8 que indica que la textura es “normal, satisfactoria”.

Calidad Total: Para obtener este valor se ponderó los parámetros apariencia, aroma, sabor y textura en un 20, 30, 30, y 20% respectivamente. Se puede observar que la mayoría de las muestras presentaron valores sobre 7.0, lo que corresponde a calidad sensorial grado I, que significa que el producto es de buena calidad organoléptica. La única muestra que presentó un valor bajo siete (6.9) es la muestra K, que por estar muy cercano al siete se puede decir que su calidad es ligeramente inferior al resto pero aún buena.

Aceptabilidad: La aceptabilidad en todas las muestras fue buena, ya que se encontraron valores entre 6.5 y 8.1. Se encontró diferencia significativa entre la muestra I, con relación a las muestras J, K, L y O. En la tabla 2 se observan que los valores de aceptabilidad para las diferentes muestras evaluadas fluctúan entre 6.5 y 8.1. Cabe hacer notar que los valores mas altos de aceptabilidad fueron para las muestras control (I, M y P) con valores de 8.1, 7.3 y 7.1 respectivamente.

Tabla 2. Valores promedio de aceptabilidad de las muestras de queso de cabra.

Muestra	Aceptabilidad
H	7.1 ^a
I	8.1 ^a
J	7.0 ^b
K	6.5 ^b
L	6.8 ^b
M	7.3 ^{ab}
N	7.2 ^{ab}
O	6.8 ^b
P	7.1 ^{ab}

Conclusiones

1. La calidad sensorial de todas las muestras evaluadas fue buena.

La aceptabilidad de las muestras de queso evaluadas en general fue buena, presentando una mejor aceptabilidad las muestras control.

Anexo 7. Instructivo de utilización de fermentos seleccionados para la elaboración de quesos



El Libano 5524
 138-11
 Santiago - Chile
 Fax : (56) 2 2214030
 Fono : (56) 2 9781474 / 1475

UNIVERSIDAD DE CHILE
INSTITUTO DE NUTRICIÓN
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Universidad de las Naciones
 Unidas

Unidad de Investigación
 y Docencia

PROYECTO: FIA -PI-C-2004-J- P - 040

MEJORAMIENTO DE LA CALIDAD Y DIFERENCIACIÓN DE QUESOS DE CABRA ELABORADOS CON LECHE PASTEURIZADA MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE FERMENTOS LÁCTICOS LOCALES SELECCIONADOS

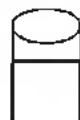
INSTRUCCIONES PARA PREPARACIÓN DE FERMENTOS

Fermentos. En un tubo cónico de 15 ml encontrará cada fermento listo para su uso. La dosis de cada fermento está calculada para 20 Litros de leche de cabra pasteurizada.

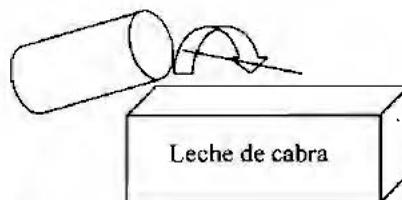
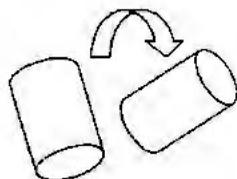
Los fermentos son

- | | |
|----------------------|---------------------|
| • Fermento 1 | para 20 lt de leche |
| • Fermento 2 | para 20 lt de leche |
| • Fermento 3 | para 20 lt de leche |
| • Fermento 4 | para 20 lt de leche |
| • Fermento 5 | para 20 lt de leche |
| • Fermento 6 | para 20 lt de leche |
| • Fermento Comercial | |

Preparación: Agregue leche de cabra a cada tubo y mezcle suavemente, invirtiendo el tubo, homogenice bien y agregue el contenido completo a 20 Litros de leche de cabra pasteurizada.



Fermento



Recuerde que este fermento esta preparando para 20 lts de leche.

- No usar otro volumen de Leche
- Utilizar todo el contenido del tubo
- Su uso es exclusivo para este proyecto

ANEXO 8: Presentación Ceremonia de Lanzamiento del Proyecto FIA-PI-C-2004-1-P-040. La Serena, abril de 2005.



Proyecto FIA-PI-C-2004-1-P-040

“Mejoramiento de la calidad y Diferenciación de Quesos de Cabra Elaborados con Leche Pasteurizada Mediante la Incorporación de Fermentos Lácticos Locales Seleccionados”

Prof. Guillermo Figueroa G.
INTA

La Serena, 25 de abril de 2005

Capacitación a productores y Reunión de apertura

- Presentación de BPA para productores del proyecto
Álvaro Figueroa
- Ceremonia de lanzamiento del proyecto
Pedro Hernández (SEREMI)
Sebastián Ganderats (FIA)
Guillermo Figueroa (INTA)



Proyecto FIA-PI-C-2004-1-P-040
Santiago, 29 de agosto de 2005





GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA



ANEXO 9: Presentación "Aseguramiento de la inocuidad en la producción caprina". La Serena, abril de 2005. Capacitación N°1.

GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

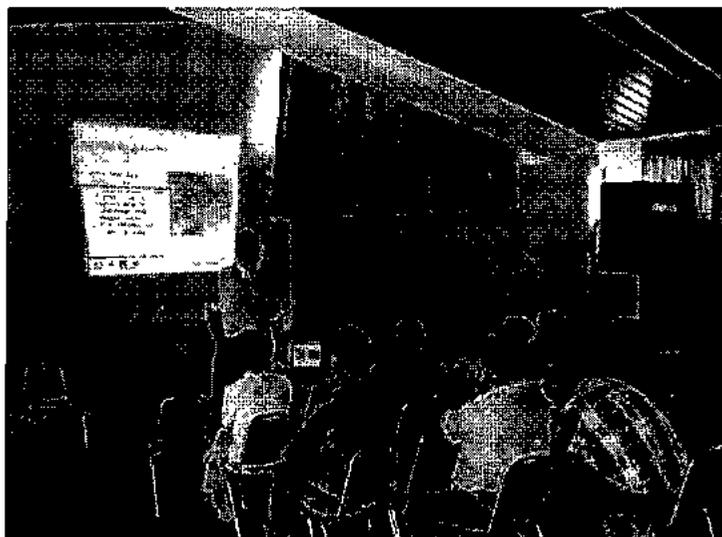
INTA
UTEM
IAPROG

"Aseguramiento de la inocuidad en la producción caprina"

Alvaro Figueroa O.
Ingeniero Agrónomo

La Serena, 25 de abril de 2005

ANEXO 10: Capacitación N°2 Presentación de resultados parciales proyecto FIA y “Aseguramiento de la inocuidad en la producción caprina”. Ovalle, diciembre de 2005.



ANEXO 11: Presentaciones efectuadas en XXVII Congreso Chileno de Microbiología. 13 al 16 de Octubre, Pucón 2005.

PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE CEPAS DE ENTEROCOCCUS AISLADOS DE QUESOS DE CABRA ARTESANAL (Technological properties of Enterococcus strains isolated from goat cheese). Rivas P, Troncoso M, Figueroa A. y Figueroa G. privas@inta.cl Laboratorio de Microbiología y Probióticos, INTA, Universidad de Chile.

Los quesos artesanales de cabra de la IV Región son altamente valorados por el consumidor pero no cumplen los criterios de inocuidad. Estos quesos poseen una rica flora láctica que determinan su aroma y sabor. Entre ellos destacan los Enterococcus en quesos de 15 (11x10⁷UFC/g) y 30 días (57x10⁶ UFC/g) de maduración, flora que es eliminada con los procesos de pasteurización. Objetivo: Evaluar mediante técnicas de screening actividad lipolítica, producción de diacetilo y exopolisacáridos en cepas de enterococos provenientes de quesos de cabra. Metodología: La actividad lipolítica se evaluó en 83 cepas en agar crema-Tween 20 y agar tributirina. Los halos de actividad fueron observados a las 48 horas de incubación. La producción de exopolisacárido se evaluó en 53 cepas en TSA glucosa 5% y TSA sucrosa 5%. La presencia de filancia se determinó a las 48 horas de incubación. La producción de diacetilo se analizó en 84 cepas mediante la reacción de Vogues-Proskauer. Resultados: Los resultados mostraron que 23/83 (28%) cepas poseían actividad lipolítica, mientras 3/53 (6%) expresaron filancia en agar sucrosa y solo una cepa mostró ambas propiedades. La producción de diacetilo fue detectada en 66/84 (79%) de las cepas estudiadas. Conclusión: Las cepas de Enterococcus evaluadas pueden encontrar potencial aplicación en la producción que quesos de cabra pasteurizados mejorados. Proyecto FIA-PI-C 2004-1

PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE CEPAS DE ENTEROCOCCUS AISLADOS DE QUESOS DE CABRA ARTESANAL
(Technological properties of Enterococcus strains isolated from goat cheese)
Rivas P., Troncoso M., Figueroa A. y Figueroa G. privas@inta.cl
Laboratorio de Microbiología, INTA, Universidad de Chile.

RESUMEN
Los quesos artesanales de cabra de la IV Región son altamente valorados por el consumidor pero no cumplen los criterios de inocuidad. Estos quesos poseen una rica flora láctica que determinan su aroma y sabor. Entre ellos destacan los Enterococcus en quesos de 15 (11x10⁷UFC/g) y 30 días (57x10⁶ UFC/g) de maduración, flora que es eliminada con los procesos de pasteurización. Objetivo: Evaluar mediante técnicas de screening actividad lipolítica, producción de diacetilo y exopolisacáridos en cepas de enterococos provenientes de quesos de cabra. Metodología: La actividad lipolítica se evaluó en 83 cepas en agar crema-Tween 20 y agar tributirina. Los halos de actividad fueron observados a las 48 horas de incubación. La producción de exopolisacárido se evaluó en 53 cepas en TSA glucosa 5% y TSA sucrosa 5%. La presencia de filancia se determinó a las 48 horas de incubación. La producción de diacetilo se analizó en 84 cepas mediante la reacción de Vogues-Proskauer. Resultados: Los resultados mostraron que 23/83 (28%) cepas poseían actividad lipolítica, mientras 3/53 (6%) expresaron filancia en agar sucrosa y solo una cepa mostró ambas propiedades. La producción de diacetilo fue detectada en 66/84 (79%) de las cepas estudiadas. Conclusión: Las cepas de Enterococcus evaluadas pueden encontrar potencial aplicación en la producción que quesos de cabra pasteurizados mejorados. Proyecto FIA-PI-C 2004-1

METODOLOGÍA
La actividad lipolítica se evaluó en 83 cepas en agar crema-Tween 20 y agar tributirina. Los halos de actividad fueron observados a las 48 horas de incubación. La producción de exopolisacárido se evaluó en 53 cepas en TSA glucosa 5% y TSA sucrosa 5%. La presencia de filancia se determinó a las 48 horas de incubación. La producción de diacetilo se analizó en 84 cepas mediante la reacción de Vogues-Proskauer.

RESULTADOS

Medio	Incubación (h)	Actividad Lipolítica (%)	Producción de Diacetilo (%)
Agar Tributirina	48	23/83 (28%)	66/84 (79%)
	96	23/83 (28%)	66/84 (79%)
Agar Tween 20	48	23/83 (28%)	66/84 (79%)
	96	23/83 (28%)	66/84 (79%)

CONCLUSIÓN
Las cepas de Enterococcus evaluadas pueden encontrar potencial aplicación en la producción que quesos de cabra pasteurizados mejorados. Proyecto FIA-PI-C 2004-1



PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE LACTOBACILLUS SP. AISLADOS DE LECHE Y QUESO DE CABRA. (Technological properties of Lactobacillus sp isolated from goat cheese). Vega N, Troncoso M, Figueroa G. Laboratorio de Microbiología y Probióticos, INTA, Universidad de Chile.

Las Bacterias Acido Lácticas participan en procesos fermentativos y de maduración del queso, entre ellas destacan las especies del género Lactobacillus ya que contribuyen al desarrollo de las características organolépticas y reológicas deseables del producto, además de contrarrestar el crecimiento de microorganismos patógenos, sin embargo al pasteurizar la leche son eliminados. Objetivo. Seleccionar cepas de Lactobacillus de leches y quesos artesanales de cabra que posean propiedades tecnológicas para aplicación industrial. Métodos. Se realizó un screening de la actividad lipolítica, producción de exopolisacárido (EPS) y producción de diacetilo en 143 cepas de Lactobacillus mesófilos provenientes de leches y quesos de cabras artesanales de la IV Región. La actividad lipolítica se evaluó en agar MRS con tributirina y tween 20. La producción de EPS se evaluó en agar MRS 5% de sucrosa y MRS 5% de glucosa. La producción de diacetilo se realizó mediante el método Voges – Proskauer en caldo MRS. Resultados. 80 de las 143(56%) cepas resultaron productoras de diacetilo; 30 (21%) y 24 (17%) mostraron filancia en medio con glucosa y sucrosa, respectivamente. Actividad lipolítica se detectó en sólo 2 cepas (1%). En general, 16 cepas (11%) de las 143 probadas fueron capaces de producir al menos dos de las propiedades tecnológicas deseables. Estas cepas serán luego probadas como fermentos en la producción de quesos. Proyecto FIA-PI-C-2004-1



PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE Lactobacillus sp AISLADOS DE LECHE Y QUESOS CABRA (Technological properties of Lactobacillus sp isolated from goat cheese)

Vega N, Troncoso M, Figueroa G.
Laboratorio de Microbiología, INTA, Universidad de Chile.



RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas participan en procesos fermentativos y de maduración del queso, entre ellas destacan las especies del género Lactobacillus ya que contribuyen al desarrollo de las características organolépticas y reológicas deseables del producto, además de contrarrestar el crecimiento de microorganismos patógenos, sin embargo al pasteurizar la leche son eliminados. Objetivo. Seleccionar cepas de Lactobacillus de leches y quesos artesanales de cabra que posean propiedades tecnológicas para aplicación industrial. Métodos. Se realizó un screening de la actividad lipolítica, producción de exopolisacárido (EPS) y producción de diacetilo en 143 cepas de Lactobacillus mesófilos provenientes de leches y quesos de cabras artesanales de la IV Región. La actividad lipolítica se evaluó en agar MRS con tributirina y tween 20. La producción de EPS se evaluó en agar MRS 5% de sucrosa y MRS 5% de glucosa. La producción de diacetilo se realizó mediante el método Voges – Proskauer en caldo MRS. Resultados. 80 de las 143(56%) cepas resultaron productoras de diacetilo; 30 (21%) y 24 (17%) mostraron filancia en medio con glucosa y sucrosa, respectivamente. Actividad lipolítica se detectó en sólo 2 cepas (1%). En general, 16 cepas (11%) de las 143 probadas fueron capaces de producir al menos dos de las propiedades tecnológicas deseables. Estas cepas serán luego probadas como fermentos en la producción de quesos. Proyecto FIA-PI-C-2004-1

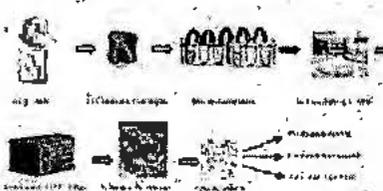
INTRODUCCIÓN

La fermentación de la leche por bacterias ácido lácticas es el primer paso en la elaboración de los quesos. Estas bacterias producen ácido láctico, que coagula la caseína y contribuye al desarrollo de las características organolépticas y reológicas deseables del producto. Además, las bacterias ácido lácticas ayudan a controlar el crecimiento de microorganismos patógenos. Sin embargo, al pasteurizar la leche, estas bacterias son eliminadas. Por lo tanto, es importante seleccionar cepas de Lactobacillus que posean propiedades tecnológicas deseables para su uso como fermentos en la producción de quesos.

OBJETIVOS

Seleccionar cepas de Lactobacillus que posean propiedades tecnológicas deseables para su uso como fermentos en la producción de quesos.

MÉTODOS EXPERIMENTALES



ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

La actividad lipolítica se evaluó en agar MRS con tributirina y tween 20. Se realizó un screening de la actividad lipolítica en 143 cepas de Lactobacillus mesófilos provenientes de leches y quesos de cabras artesanales de la IV Región. La actividad lipolítica se evaluó en agar MRS con tributirina y tween 20. Se realizó un screening de la actividad lipolítica en 143 cepas de Lactobacillus mesófilos provenientes de leches y quesos de cabras artesanales de la IV Región. La actividad lipolítica se evaluó en agar MRS con tributirina y tween 20. Se realizó un screening de la actividad lipolítica en 143 cepas de Lactobacillus mesófilos provenientes de leches y quesos de cabras artesanales de la IV Región.



Figura 1. Actividad lipolítica en agar MRS con tributirina y tween 20.



Figura 2. Actividad lipolítica en agar MRS con tributirina y tween 20.

PRODUCCIÓN DE EPS

La producción de EPS se evaluó en agar MRS 5% de sucrosa y MRS 5% de glucosa. Se realizó un screening de la producción de EPS en 143 cepas de Lactobacillus mesófilos provenientes de leches y quesos de cabras artesanales de la IV Región. La producción de EPS se evaluó en agar MRS 5% de sucrosa y MRS 5% de glucosa. Se realizó un screening de la producción de EPS en 143 cepas de Lactobacillus mesófilos provenientes de leches y quesos de cabras artesanales de la IV Región.

CONCLUSIONES

Se seleccionaron 16 cepas de Lactobacillus que posean propiedades tecnológicas deseables para su uso como fermentos en la producción de quesos. Estas cepas serán luego probadas como fermentos en la producción de quesos.

ANEXO 12: Presentaciones efectuadas al XXVIII Congreso Chileno y XXVIII Latinoamericano de Microbiología. 23 al 26 de Octubre, Pucón 2006.

CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE QUESOS DE CABRA ARTESANALES DE LA IV REGIÓN.

Figueroa A, Troncoso M, Rivas P, Adiazola P., Figueroa G. afigueroa@inta.cl. Laboratorio de Microbiología y Probióticos, INTA, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Introducción: Los quesos artesanales de cabra se producen principalmente en la IV Región (80%), y son una importante fuente del ingreso familiar de sus habitantes. Los ingresos son magros por la contaminación con patógenos, que inhibe la demanda. **Objetivo:** Determinar la calidad microbiológica de leche y quesos producidos por pequeños productores de la IV Región. **Métodos:** Se analizaron 100 muestras: 37 de leche, 30 de queso fresco (15 días) y 33 de queso maduro (30 días). Las muestras se transportaron refrigeradas (4°C) al Laboratorio de Microbiología del INTA, donde se determinó la presencia de *S. aureus* y *Salmonella*, junto con RAM y recuento de Enterobacteriaceas. **Resultados:** Los resultados de la leche mostraron que 9/36, (25%) tenía un RAM superior a 10⁶ gr/ml (rechazo RSA). Para queso fresco, resultó que 3/29 (10%) tuvo recuentos de *S. aureus* superiores a 10² gr/ml (rechazo RSA) y 26/29 (90%) sobrepasó los 10² gr/ml de Enterobacteriaceas (rechazo RSA). Para queso maduro, 6/29 (21%) superó los límites de *S. aureus* y un 76% (25/33) los de Enterobacterias. **Conclusiones:** La presencia de baja contaminación en la leche de cabra y el incremento de ella en los quesos, confirma el no cumplimiento de las Buenas Prácticas Agrícolas y de Manufactura y limita su acceso a los mercados formales de comercialización. **Financiamiento:** FIA-PI-C-2004-1-P-040



CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE QUESOS DE CABRA ARTESANALES DE LA IV REGIÓN

Microbiological quality of goat cheeses from the IV Region

Figueroa A, Troncoso M, Rivas P y Figueroa G. afigueroa@inta.cl
Lab. Microbiología y Probióticos - INTA - Universidad de Chile
www.inta.cl



INTRODUCCIÓN

En Chile, la industria de quesos artesanales en la IV Región produce un total de 751.000 toneladas con un 40% de producción en la IV Región. Este tipo de producción resulta un ingreso económico y en zonas remotas, con una importante fuente de ingreso familiar de sus habitantes.

La producción de queso, que representa el 60% de los ingresos familiares de muchos productores de la zona, se realiza en condiciones de higiene y control sanitario deficientes.

La leche, la leche cruda y el queso artesanal de cabra que se produce en la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

RESULTADOS

Se analizaron 100 muestras de leche y queso artesanal de cabra, producidas en la zona de estudio, en el Laboratorio de Microbiología y Probióticos del INTA, donde se determinó la presencia de *S. aureus* y *Salmonella*, junto con RAM y recuento de Enterobacteriaceas.

Los resultados de la leche mostraron que 9/36, (25%) tenía un RAM superior a 10⁶ gr/ml (rechazo RSA).

Para queso fresco, resultó que 3/29 (10%) tuvo recuentos de *S. aureus* superiores a 10² gr/ml (rechazo RSA) y 26/29 (90%) sobrepasó los 10² gr/ml de Enterobacteriaceas (rechazo RSA).

Para queso maduro, 6/29 (21%) superó los límites de *S. aureus* y un 76% (25/33) los de Enterobacterias.

La presencia de baja contaminación en la leche de cabra y el incremento de ella en los quesos, confirma el no cumplimiento de las Buenas Prácticas Agrícolas y de Manufactura y limita su acceso a los mercados formales de comercialización.

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

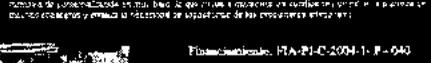
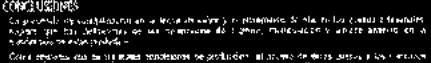
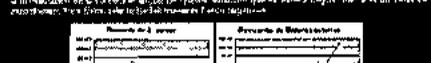
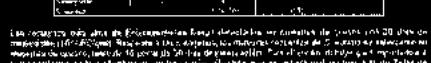
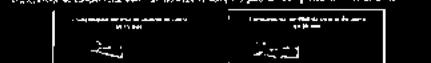
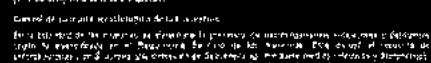
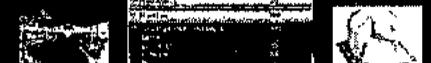
El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).

El queso de cabra artesanal de la zona, no cumple con los requisitos de inocuidad establecidos en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA).



BUENAS PRÁCTICAS EN PRODUCTORES DE QUESO DE CABRA ARTESANAL DE LA IV REGIÓN. Figueroa A, Troncoso M, Rivas P, Cotteland M, Figueroa G. afigueroa@inta.cl. Laboratorio de Microbiología y Probióticos, INTA, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Introducción: La comercialización de quesos de cabra artesanales se efectúa principalmente en mercados informales, ya que no cumplen con los requisitos mínimos de inocuidad. Los programas de Buenas Prácticas permiten mejorar los sistemas productivos tanto en la calidad como en la inocuidad. **Objetivo:** Determinar el nivel de cumplimiento de pre-requisitos por parte de pequeños productores (X 184 animales) de queso de cabra de la IV Región. **Material y Métodos:** Se diseñó y aplicó un checklist de evaluación de pre-requisitos (infraestructura, BPA, BPM y BPH) a 18 productores de queso de cabra, entre junio y julio de 2006 además de una inspección directa de las plantas. Las plantas fueron ubicadas en tres niveles de cumplimiento: Nivel 1 ($\geq 75\%$); Nivel 2 (50 - 74%); Nivel 3: (< 50%). **Resultados:** Se observó un bajo nivel de cumplimiento de pre-requisitos, con un promedio de 54%. Los resultados ubicaron 6 plantas en el nivel 1; 5 en nivel 2 y 7 plantas en nivel 3, indicando que 9/18 (50%) de los productores cuenta con un nivel de implementación inferior al 50%. Además ninguna de las plantas se encuentra registrada en el programa PABCO (SAG). **Conclusiones:** La mitad de los productores no cumple con las exigencias mínimas de calidad e inocuidad de sus quesos. Capacitación y recursos son requeridos con urgencia. **Financiamiento:** FIA-PI-C-2004-1-P-040



BUENAS PRÁCTICAS EN PRODUCTORES DE QUESOS DE CABRA ARTESANAL DE LA IV REGIÓN

Good practices in goat cheese producers of the IV region
Figueroa A, Troncoso M, Rivas P y Figueroa G. afigueroa@inta.cl
Lab. Microbiología y Probióticos - INTA - Universidad de Chile
www.inta.cl



INTRODUCCIÓN

La salud de los consumidores de alimentos ha sido objeto de intenso estudio por parte de la industria y el consumidor. Esto se debe a que los consumidores están cada vez más preocupados por la inocuidad de los alimentos que consumen. Los programas de Buenas Prácticas permiten mejorar los sistemas productivos tanto en la calidad como en la inocuidad.

OBJETIVO

Determinar el nivel de cumplimiento de pre-requisitos por parte de pequeños productores de queso de cabra de la IV Región.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se diseñó y aplicó un checklist de evaluación de pre-requisitos (infraestructura, BPA, BPM y BPH) a 18 productores de queso de cabra, entre junio y julio de 2006 además de una inspección directa de las plantas. Las plantas fueron ubicadas en tres niveles de cumplimiento: Nivel 1 ($\geq 75\%$); Nivel 2 (50 - 74%); Nivel 3: (< 50%).

RESULTADOS

Se observó un bajo nivel de cumplimiento de pre-requisitos, con un promedio de 54%. Los resultados ubicaron 6 plantas en el nivel 1; 5 en nivel 2 y 7 plantas en nivel 3, indicando que 9/18 (50%) de los productores cuenta con un nivel de implementación inferior al 50%. Además ninguna de las plantas se encuentra registrada en el programa PABCO (SAG).

CONCLUSIONES

La mitad de los productores no cumple con las exigencias mínimas de calidad e inocuidad de sus quesos. Capacitación y recursos son requeridos con urgencia.

Financiamiento: FIA-PI-C-2004-1-P-040



EVOLUCION DE MICROBIOTA LACTICA DURANTE LA MADURACION DE QUESO DE CABRA ARTESANAL. Rivas P¹, Troncoso M¹, Faúndez G², Figueroa A¹, Morales ME¹ y Figueroa G¹. privas@inta.cl. ¹Laboratorio de Microbiología y Probióticos, INTA, U.de Chile, ² Lab Biotecnología, UTEM, Santiago de Chile.

Los quesos de cabra artesanales de la IV Región son de buena calidad organoléptica, pero de baja calidad microbiológica debido al empleo de leche no pasteurizada. **Objetivo:** Identificar y cuantificar la microbiota ácido-láctica en la maduración de quesos de cabra elaborados por PYMES de la IV Región. **Métodos:** Se analizaron 7 quesos de cabra artesanal a los 15 y 30 días de maduración. Se aisló e identificó mediante pruebas bioquímicas: *Lactobacillus* mesófilos y termófilos, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*. Se cuantificó mediante recuento en placa en medios selectivos y específicos para cada género. Los recuentos se expresaron como la mediana (UFC/gr). **Resultados:** *Lactobacillus* mesófilos, *Leuconostoc* y *Enterococcus* mostraron recuentos altos (10^6 - 10^7 UFC/gr) y constantes durante todo el periodo de maduración. *Lactobacillus* termófilos en cambio mostraron una caída brusca en los recuentos, de 20×10^5 con 15 días, a 10^2 UFC/gr a los 30 días. En cambio cepas de *Streptococcus* tuvieron un aumento significativo en sus recuentos, desde 10^2 UFC/gr a 40×10^6 UFC/gr hacia el final del periodo de maduración. **Conclusión:** Se dispone de la microbiota láctica asociada a la maduración del queso de cabra en la IV Región, fermentos que podrían servir para elaborar un producto regional e inocuo preparado con leche de cabra pasteurizada. **Financiamiento:** FIA-PI-C-2004-I-P-040



EVOLUCION DE MICROBIOTA LACTICA DURANTE LA MADURACION DE QUESO DE CABRA ARTESANAL.
Evolution of microbial populations during goat cheese ripening.
Rivas P¹, Troncoso M¹, Faúndez G², Figueroa A¹, Morales ME¹ y Figueroa G¹.
Las Mesetas 1, N. de Chile, ² Laboratorio de Biotecnología, UTEM, Santiago de Chile.



INTRODUCCION

Los quesos de cabra artesanales producidos en la IV Región de Chile de reconocida calidad organoléptica, pero de baja calidad microbiológica debido al empleo de leche no pasteurizada. El objetivo de este estudio es identificar y cuantificar la microbiota ácido-láctica en la maduración de quesos de cabra elaborados por PYMES de la IV Región. Se analizaron 7 quesos de cabra artesanal a los 15 y 30 días de maduración. Se aisló e identificó mediante pruebas bioquímicas: *Lactobacillus* mesófilos y termófilos, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*. Se cuantificó mediante recuento en placa en medios selectivos y específicos para cada género. Los recuentos se expresaron como la mediana (UFC/gr). *Lactobacillus* mesófilos, *Leuconostoc* y *Enterococcus* mostraron recuentos altos (10^6 - 10^7 UFC/gr) y constantes durante todo el periodo de maduración. *Lactobacillus* termófilos en cambio mostraron una caída brusca en los recuentos, de 20×10^5 con 15 días, a 10^2 UFC/gr a los 30 días. En cambio cepas de *Streptococcus* tuvieron un aumento significativo en sus recuentos, desde 10^2 UFC/gr a 40×10^6 UFC/gr hacia el final del periodo de maduración. **Conclusión:** Se dispone de la microbiota láctica asociada a la maduración del queso de cabra en la IV Región, fermentos que podrían servir para elaborar un producto regional e inocuo preparado con leche de cabra pasteurizada. **Financiamiento:** FIA-PI-C-2004-I-P-040

RESULTADOS

Se analizaron 7 quesos de cabra artesanal producidos en la IV Región de Chile a los 15 y 30 días de maduración. Se aisló e identificó mediante pruebas bioquímicas: *Lactobacillus* mesófilos y termófilos, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*. Se cuantificó mediante recuento en placa en medios selectivos y específicos para cada género. Los recuentos se expresaron como la mediana (UFC/gr). *Lactobacillus* mesófilos, *Leuconostoc* y *Enterococcus* mostraron recuentos altos (10^6 - 10^7 UFC/gr) y constantes durante todo el periodo de maduración. *Lactobacillus* termófilos en cambio mostraron una caída brusca en los recuentos, de 20×10^5 con 15 días, a 10^2 UFC/gr a los 30 días. En cambio cepas de *Streptococcus* tuvieron un aumento significativo en sus recuentos, desde 10^2 UFC/gr a 40×10^6 UFC/gr hacia el final del periodo de maduración.

CONCLUSIONES - CONCLUSION

Se dispone de la microbiota láctica asociada a la maduración del queso de cabra en la IV Región, fermentos que podrían servir para elaborar un producto regional e inocuo preparado con leche de cabra pasteurizada. **Financiamiento:** FIA-PI-C-2004-I-P-040

Tabla 1: Características de los quesos analizados

Queso	Marca y Elaboración (a. de inicio)	Proceso de Maduración
1	146 g - 17 por 19 22 mm	Maduración natural (15 días)
2	146 g - 17 por 19 22 mm	Maduración natural (30 días)
3	146 g - 17 por 19 22 mm	Maduración natural (15 días)
4	146 g - 17 por 19 22 mm	Maduración natural (30 días)
5	146 g - 17 por 19 22 mm	Maduración natural (15 días)
6	146 g - 17 por 19 22 mm	Maduración natural (30 días)
7	146 g - 17 por 19 22 mm	Maduración natural (15 días)

Tabla 2: Evolución de la microbiota láctica durante la maduración

Queso	15 días (UFC/gr)	30 días (UFC/gr)
1	10^6	10^6
2	10^6	10^6
3	10^6	10^6
4	10^6	10^6
5	10^6	10^6
6	10^6	10^6
7	10^6	10^6

Figura 1: Gráfico de barras que muestra la evolución de la microbiota láctica durante la maduración de los 7 quesos de cabra artesanal.

CARACTERIZACION DE LAS PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DE QUESOS ARTESANALES DE CABRA. Faúndez G, Troncoso M, Rivas P, Figueroa A, Gotteland M, Figueroa G. Lab. Biotecnología, UTEM, Santiago, Chile. gustavo_faundez@yahoo.com Laboratorio de Microbiología y Probióticos. INTA, Universidad de Chile, Santiago Chile

La microbiota láctica contribuye activamente a la calidad de los quesos. Se caracterizaron las propiedades tecnológicas de bacterias lácticas aisladas de quesos artesanales de cabra de la IV Región. Se aislaron 507 cepas (143 *Lactobacillus* mesófilos, 45 *Lactobacillus* termófilos, 130 *Enterococcus*, 79 *Lactococcus*, 49 *Leuconostoc* y 61 *Streptococcus*). Se evaluaron las actividades: 1) acidificante (titulación de acidez total); 2) lipolítica (liberación de ácidos grasos libres a partir de tributirina); 3) proteolítica (liberación de aminoácidos libres a partir de proteínas de leche al 10%); 4) productora de diacetilo (medición por cromatografía a partir de los sobrenadantes de cultivo); 5) productora de exopolisacárido (EPS) (método de fenol-ácido sulfúrico); 6) antibacteriana frente a *Salmonella*, *S. aureus* y *E. coli* (ensayo de inhibición en placa). De las 507 cepas evaluadas, 11 (2.2%) tuvieron una alta actividad acidificante, 26 (5.1%) una fuerte actividad lipolítica, 24 (4.7%) una alta actividad proteolítica, 6 (1.2%) fueron importantes productores de diacetilo, 59 (11.6%) mostraron altos niveles de EPS (>50µg/109bac) y 38 (7.5%) ejercieron un actividad bacteriana en contra de uno o más patógenos. Estos microorganismos podrían ser de interés a nivel agroindustrial. Financiamiento: FIA-PI-C-2004-1-P-040

CARACTERIZACION DE LAS PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DE QUESOS ARTESANALES DE CABRA.

Faúndez G, Troncoso M, Rivas P, Figueroa A, Gotteland M, Figueroa G, Laboratorios de Microbiología, UTEM e INTA, Univ. de Chile Macul 1242, Macul, Santiago

Introducción
Los lactobacilos (*Lactobacillus*) son bacterias Gram positivas, aerobias facultativas, bacilos que se encuentran en el tracto gastrointestinal humano y en los productos lácteos. Se caracterizaron las propiedades tecnológicas de bacterias lácticas aisladas de quesos artesanales de cabra de la IV Región. Se aislaron 507 cepas (143 *Lactobacillus* mesófilos, 45 *Lactobacillus* termófilos, 130 *Enterococcus*, 79 *Lactococcus*, 49 *Leuconostoc* y 61 *Streptococcus*). Se evaluaron las actividades: 1) acidificante (titulación de acidez total); 2) lipolítica (liberación de ácidos grasos libres a partir de tributirina); 3) proteolítica (liberación de aminoácidos libres a partir de proteínas de leche al 10%); 4) productora de diacetilo (medición por cromatografía a partir de los sobrenadantes de cultivo); 5) productora de exopolisacárido (EPS) (método de fenol-ácido sulfúrico); 6) antibacteriana frente a *Salmonella*, *S. aureus* y *E. coli* (ensayo de inhibición en placa). De las 507 cepas evaluadas, 11 (2.2%) tuvieron una alta actividad acidificante, 26 (5.1%) una fuerte actividad lipolítica, 24 (4.7%) una alta actividad proteolítica, 6 (1.2%) fueron importantes productores de diacetilo, 59 (11.6%) mostraron altos niveles de EPS (>50µg/109bac) y 38 (7.5%) ejercieron un actividad bacteriana en contra de uno o más patógenos. Estos microorganismos podrían ser de interés a nivel agroindustrial. Financiamiento: FIA-PI-C-2004-1-P-040

Objetivo
El objetivo de este estudio fue caracterizar las propiedades tecnológicas de bacterias lácticas aisladas de quesos artesanales de cabra de la IV Región, evaluando sus actividades acidificantes, lipolíticas, proteolíticas, productoras de diacetilo, productoras de exopolisacárido y antibacterianas.

Metodología
Se aislaron un total de 507 cepas de bacterias lácticas a partir de 29 muestras de queso con 15 días de maduración y 13 de queso con 30 días de maduración, provenientes de 20 queseros productores de la IV Región. Los distintos grupos de bacterias lácticas presentes en las muestras se aislaron en medio selectivo (DOD, M17, ST, Agar-aurifluores). En las cepas lácticas aisladas se evaluaron las siguientes actividades:
1) La actividad acidificante se evaluó mediante el método de titulación de acidez total.
2) Para evaluar la actividad lipolítica se realizó un procesamiento en medio selectivo (Tributirina) y se midió la liberación de ácidos grasos libres a partir de la tributirina.
3) La actividad proteolítica se evaluó mediante el método de liberación de aminoácidos libres a partir de las proteínas de leche al 10%.
4) La actividad productora de diacetilo se evaluó mediante el método de medición por cromatografía a partir de los sobrenadantes de cultivo.
5) La actividad productora de exopolisacárido (EPS) se evaluó mediante el método de fenol-ácido sulfúrico.
6) La actividad antibacteriana frente a *Salmonella*, *S. aureus* y *E. coli* se evaluó mediante el ensayo de inhibición en placa.

Resultados

De las 507 cepas aisladas, se aislaron 507 cepas lácticas:
- 143 *Lactobacillus* mesófilos
- 45 *Lactobacillus* termófilos
- 130 *Enterococcus*
- 79 *Lactococcus*
- 49 *Leuconostoc*
- 61 *Streptococcus*

Las actividades tecnológicas de las bacterias lácticas aisladas de este queso se presentaron de la siguiente forma:

Cepas lácticas	Productoras de EPS	Actividad acidificante	Actividad lipolítica	Actividad proteolítica	Actividad productora de diacetilo	Actividad antibacteriana
Toda la muestra						
Lactobacillus mesófilos						
Lactobacillus termófilos						
Enterococcus						
Lactococcus						
Leuconostoc						
Streptococcus						
Total						



Conclusiones
Algunas de las EPS de las cepas lácticas aisladas de queso artesanal de cabra presentan propiedades de mayor viscosidad y pueden ser utilizadas como fermentos para el desarrollo de queso procesado con el objetivo de mejorar la calidad de este producto.
Financiado por FIA-PI-C-2004-1-P-040



DESCRIPCIÓN MEDIANTE PCR-TTGE DE LA MICROBIOTA LÁCTICA DE QUESOS ARTESANALES DE CABRA. Codriansky Y, Romero J, Navarrete P, Faúndez G, Figueroa G, Gotteland M. yaelcodri@yahoo.com Laboratorio de Microbiología y Probióticos. INTA, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

Se evaluó la biodiversidad de la microbiota láctica dominante de quesos artesanales de cabra producidos en valle y cordillera de la IV Región. Se extrajo el ADN bacteriano total de 70 muestras de quesos de 15 y 30 días de maduración. Se amplificó el ADNr 16S mediante PCR con partidores específicos para bacterias lácticas y los amplicones obtenidos fueron separados por electroforesis en gradiente de temperatura (TTGE). Posteriormente se secuenciaron las bandas de interés para su identificación. Se observaron entre 1 y 5 bandas por muestras. El índice de biodiversidad de Shannon no presentó diferencias significativas entre muestras de 15 y 30 días (0.61 ± 0.08 vs 0.55 ± 0.10) ni entre muestras de cordillera y de valle (0.57 ± 0.13 vs 0.58 ± 0.11). Los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* se encontraron en todos los productos analizados mientras que *Enterococcus* y *Weissella* se observaron sólo en muestras de cordillera. La microbiota láctica presente en los quesos no varía según la zona geográfica y permanece constante durante el proceso de maduración del queso. Financiamiento: FIA-PI-C-2004-1-P-040

DESCRIPCIÓN MEDIANTE PCR-TTGE DE LA MICROBIOTA LÁCTICA DE QUESOS ARTESANALES DE CABRA

Codriansky Y, Romero J, Navarrete P, Faúndez G, Figueroa G, Gotteland M
Lab. de Microbiología INTA e UTEM, Lab. de Biotecnología INTA, Universidad de Chile



Introducción

En la elaboración de quesos artesanales de cabra participan bacterias lácticas naturalmente presentes en la leche cruda, que por su actividad acidificante y proteolítica que promueven la fermentación de la lactosa y la coagulación y digestión de la caseína. Esto genera productos que contribuyen a formar la textura, proteica y la riqueza del queso. Se postula que las diferentes variedades lácteas, como el origen, los procesos de fermentación y maduración del queso. La relevancia de estos factores puede evaluar su importancia y el impacto que cada población viable genera en estos procesos.

Las comunidades lácteas presentes en el queso pueden ser caracterizadas mediante métodos moleculares como el PCR-TTGE que permite la separación de los productos de amplificación del DNA bacteriano bajo un gradiente de temperatura y condiciones determinadas. La aplicación de dichos métodos depende de su "PCR", obteniéndose un perfil de bandas características para cada especie, siendo cada banda un polifenilo láctico diferente.

Objetivo

Describir la diversidad láctica de los quesos artesanales de cabra producidos en diferentes zonas geográficas de la IV Región.

Metodología

Extracción del ADN bacteriano total mediante el uso de kits comerciales.

Amplificación del ADN bacteriano por PCR con partidores específicos para bacterias lácticas (16S) que amplifica 200bp y 150bp respectivamente de la región V3 y V4 del 16S rDNA.

Separación de los fragmentos de ADN por electroforesis en gradiente de temperatura (TTGE).

Secuenciación de las bandas de interés para su identificación.

Resultados

Se obtuvieron 70 perfiles de bandas (15 y 30 días de maduración) provenientes de 9 productores de valle y de 11 productores de cordillera.

Se observó que los perfiles de bandas obtenidos por PCR de los quesos artesanales de cabra producidos en valle y cordillera de la IV Región, no presentaron diferencias significativas entre ellos. Esto sugiere que la microbiota láctica presente en los quesos no varía según la zona geográfica y permanece constante durante el proceso de maduración del queso.

Región	Maduración	Proveedores	Bandas	Identificación
Valle	15 días	1	1	<i>Lactobacillus</i>
		2	2	<i>Lactobacillus</i>
		3	3	<i>Lactobacillus</i>
Cordillera	15 días	4	4	<i>Lactobacillus</i>
		5	5	<i>Lactobacillus</i>
		6	6	<i>Lactobacillus</i>

Tabla 1. Datos con los que se generaron los perfiles de bandas de los quesos artesanales de cabra.

Región	Maduración	Proveedores	Bandas	Identificación
Valle	15 días	1	1	<i>Lactobacillus</i>
		2	2	<i>Lactobacillus</i>
		3	3	<i>Lactobacillus</i>
Cordillera	15 días	4	4	<i>Lactobacillus</i>
		5	5	<i>Lactobacillus</i>
		6	6	<i>Lactobacillus</i>

Conclusiones

Los resultados muestran que los quesos artesanales de cabra producidos en valle y cordillera de la IV Región, no presentaron diferencias significativas entre ellos. Esto sugiere que la microbiota láctica presente en los quesos no varía según la zona geográfica y permanece constante durante el proceso de maduración del queso.

Anexo 13. Resúmenes de tesis desarrolladas durante el proyecto.

Caracterización de la microbiota láctica de quesos artesanales de cabra mediante PCR-TTGE-secuenciación

Memoria de Título Entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular por:

Yael Carolina Codriansky Rodríguez

Director de Tesis: Dr. Martín Gotteland; Co-Director de Tesis: Dr. Jaime Romero
Profesor Patrocinante: Dra. Margarita Carú

RESUMEN

Antecedentes: Un factor importante en la elaboración de quesos artesanales es la flora láctica naturalmente presente en la leche después de la ordeña, y que participa tanto en el proceso de fermentación como en el de maduración del queso. Dicha microbiota láctica forma un ecosistema complejo que es específico para cada tipo de queso e influye sobre sus características organolépticas. Dicho ecosistema no ha sido caracterizado en el caso de los quesos artesanales de cabra elaborado en Chile. **Objetivo:** Caracterizar la microbiota láctica durante el proceso de elaboración de quesos artesanales de cabra provenientes de zonas de valle o de cordillera de la IV Región. **Material y métodos:** Se extrajo ADN bacteriano a partir de muestras de leche y de quesos con 15 y 30 días de maduración. Luego se amplificó dicho ADN por PCR usando partidores, HDA para eubacteria o LAC para bacterias lácticas, que amplificaban regiones variables del ADN ribosomal 16S. Los amplicones obtenidos fueron separados por electroforesis en gradiente temporal de temperatura (TTGE) y los perfiles de bandas obtenidos fueron comparados en función de la proveniencia de los quesos (valle o cordillera) y de su tiempo de maduración (15 o 30 días). Las principales bandas que diferían por su movilidad electroforética fueron eximidas y el ADN presente en ellas fue eluido, reamplificado por PCR y luego secuenciado para identificar las bandas originales. **Resultados:** En las muestras de leche analizadas se detectaron los géneros *Streptococcus* y *Lactococcus* con los partidores HDA y *Leuconostoc* con LAC. Se observó que la microbiota dominante en los quesos está constituida por los 4 géneros bacterianos *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*, en orden decreciente. Al comparar las muestras de valle y cordillera se observó que *Weissella* era el único género que difiere entre ambos orígenes, siendo presente solo en las muestras de Cordillera. No se detectaron cambios importantes en los géneros bacterianos detectados entre los quesos de 15 y 30 días de maduración. Las bandas correspondientes a *Lactobacillus* sp. fueron identificadas por secuenciación como *L. plantarum*, *L. paraplantarum* y *L. pentosus*. **Conclusión:** Los quesos de valle y cordillera se diferencian solo por la presencia de *Weissella* en esos últimos. Las poblaciones dominantes del queso no varían entre los 15 y 30 días de maduración.



“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *LACTOBACILLUS Sp.* AISLADOS DE LECHES Y QUESOS DE CABRA”

Trabajo de Titulación para optar al Título de Ingeniero en Industria Alimentaria en la Universidad Técnica Metropolitana

Natalia Vega Salgado

Profesor Guía: Sr. Guillermo Figueroa Gronemeyer; Profesor Patrocinante: Sr. Gustavo Faúndez

RESUMEN

Los quesos artesanales de la IV Región utilizan leche de cabra cruda para su elaboración. Esto se realiza en condiciones de ordeña e higiene que normalmente son muy primitivas y que generalmente no cumplen con los requerimientos del Servicio Nacional de Salud por lo que el producto suele presentar altos niveles de contaminación y por lo mismo son fuentes de intoxicaciones en los consumidores.

Debido a esto se ha comenzado a pasteurizar la leche de cabra con el fin de disminuir el riesgo de contaminación del producto y a su vez eliminar intoxicaciones. Sin embargo con este procedimiento se elimina a los microorganismos patógenos, pero también acaba con la flora láctica autóctona, la cual está relacionada con la fermentación, maduración y con las características organolépticas que le dan la especificidad propia de cada queso.

El objetivo de este estudio fue aislar e identificar propiedades tecnológicas de cepas de *Lactobacillus sp.* aislados de leches y quesos de cabra para ser usados posteriormente como fermentos lácticos.

El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Probióticos del INTA, de 26 queserías de la IV Región. Analizándose un total de 87 muestras de tres periodos de producción, de ellas 25 son leches, 29 son quesos de 15 días y 33 son quesos de 30 días de maduración.

El recuento promedio de Lactobacilos mesófilos en leches fue de $2,6 \times 10^4$ UFC/ml; en quesos de 15 días fue de $1,0 \times 10^8$ UFC/gr. y para quesos de 30 días fue de $1,7 \times 10^8$ UFC/gr. Para el caso de Lactobacilos termófilos el recuento promedio en leches fue de $6,3 \times 10^3$ UFC/ml; para quesos de 15 días fue de $7,2 \times 10^6$ UFC/gr. y para quesos de 30 días fue de $1,8 \times 10^4$ UFC/gr.

Obteniéndose 143 cepas de Lactobacilos mesófilos y 37 cepas de Lactobacilos termófilos, la confirmación de estas cepas fue mediante una serie de pruebas bioquímicas tales como catalasa, movilidad, hidrólisis de la esculina, indol y reducción de nitritos.

Con el objetivo de seleccionar las cepas con propiedades tecnológicas óptimas para la formulación de los fermentos iniciadores se evaluó las actividades acidificantes, actividades lipolíticas, producción de exopolisacáridos y diacetilo, y actividad antibacteriana frente a enteropatógenos en las cepas anteriormente mencionadas.

De los resultados obtenidos, se puede decir que los *Lactobacillus* poseen relativamente alta producción de exopolisacáridos y de diacetilo, también una elevada actividad antibacteriana, escasa actividad acidificante y nula actividad lipolítica y proteolítica.

De lo anterior se infiere que el conjunto de Lactobacilos hace de ellos un buen fermento láctico, sin embargo es importante estudiar distintos tipos de especies, combinación entre las mismas y la cantidad de fermentos a añadir para lograr un efecto positivo en el desarrollo del sabor y aroma del queso.

SELECCIÓN DE CEPAS LÁCTICAS CON PROPIEDADES PROBIÓTICAS AISLADAS DE LECHE Y QUESO DE CABRA ARTESANAL

Trabajo de Titulación para optar al Título de Ingeniero en Industria Alimentaria en la Universidad Técnica Metropolitana

Karen Ríos Muller
Catherine Gutierrez Muñoz

RESUMEN

Las bacterias lácticas se encuentran en el ambiente, alimentos fermentables y ser humano. Estas tienen una amplia aplicación en la industria alimentaria, y son considerados organismos GRAS (Generally Recognized as Safe). Diversos estudios han mostrado que las cepas lácticas son beneficiosas para la salud humana, particularmente aquellas con características probióticas. Las cepas probióticas se pueden consumir en alimentos (alimentos funcionales) o en concentrados bacterianos disponible comercialmente y utilizados internacionalmente (Lactobacillus GG, Lactobacillus LA - 1). Los beneficios reportados incluyen disminución de los síntomas de diarrea, estimulación del sistema inmune, alivio y prevención de los síntomas de intolerancia a la lactosa, actividad anticancerígena.

El objetivo de nuestro estudio fue seleccionar cepas ácido lácticas, con propiedades probióticas aisladas de leche y queso de cabra artesanal de la IV Región y se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Tecnológica Metropolitana (UTEM),

Se incluyeron 700 cepas lácticas aisladas en los medios selectivos MRS, M17 y ST las que se mantuvieron conservadas a -70°C .

En la selección de las cepas, se utilizó primero un ensayo de actividad antibacteriana usando la técnica de doble capa. Las cepas que presentaron esta actividad, se incluyeron en los ensayos para determinar resistencia a condiciones ácidas ($\text{pH } 3$) y a bilis (0.5, 1.0 y 2.0 %). Las cepas que presentaron una mayor resistencia a acidez y bilis fueron seleccionadas para el ensayo in vitro de adhesión a células intestinales humanas. Se identificó un número reducido de cepas que presentaron adherencia, mediante PCR.

Del total de 700 cepas estudiadas, 26 presentaron actividad inhibitoria no atribuible a acidez en contra de los microorganismos patógenos o alteradores ensayados (Salmonella, E. coli 0157, S. aureus y Pseudomona sp). De estas 26, 12 mostraron una alta tolerancia a pH ácido (3,0) y a concentraciones de bilis de 1% o más. Se realizó un ensayo in vitro de adherencia con la línea celular Caco-2, de origen intestinal humano cuales con estas cepas, presentando 5 de ellas resultados positivos. Se identificaron a nivel de género 3 cepas seleccionadas resultando ser de los géneros Lactobacillus, Lactococcus y Pediococcus. Estas cepas se han seleccionado para posteriores estudios que puedan llevar a una potencial utilización en alimentos funcionales



12. Bibliografía consultada

1. Caplice E, Fitzgerald GF. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int J Food Microbiol* 1999; 50: 131-49.
2. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Prot* 61(12):1636-43.
3. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. 2001. Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli *J Food Prot*. 64(12):2007-14.
4. Giraffa G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol Rev*. 2004;28: 251-60.
5. Wouters JTM, Ayad EHE, Hugenholtz J, Smit S. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int Dairy J* 2002; 12: 91-109.
6. Hansen EB. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int J Food Microbiol* 2002; 78: 119-31.
7. Fleet GH. Microorganisms in food ecosystems. *Int J Food Microbiol* 1999, 50: 101-17.
8. Kieronczyk A, Skeie S, Langsrud T, Yvon M. Cooperation between *Lactococcus lactis* and nonstarter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 734-9.
9. Fitzsimons NA, Cogan TM, Condon S, Beresford T. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 3418-26.
10. Olive DM, Bean P. *J Clin Microbiol*. 1999 Jun;37(6):1661-9. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1661-9.
11. O'sullivan DJ, Klaenhammer TR. 1993. Rapid Mini-Prep Isolation of High-Quality Plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Appl Environ Microbiol*. 59(8):2730-2733.
12. Fitzsimons NA, Cogan TM, Condon S, Beresford T. Spatial and temporal distribution of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *J Appl Microbiol* 2001; 90: 600-8.
13. Ercolini D, Moschetti G, Blaiotta G, Coppola S. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Syst Appl Microbiol* 2001; 24: 610-7.
14. Ogier JC, Son O, Gruss A, Tailliez P, Delacroix-Buchet A. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 3691-701.
15. Ogier JC, Lafarge V, Girard V, Rault A, Maladen V, Gruss A, Leveau JY, Delacroix-Buchet A. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 5628-43.
16. Randazzo CL, Torriani S, Akkermans AD, de Vos WM, Vaughan EE. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 1882-92.