

UNIVERSIDAD PARA LA COOPERACIÓN INTERNACIONAL
UCI



IMPACTO DE LA PRESENCIA DE *Bacillus sporothermodurans* EN LOTES DE
LECHE UHT PRODUCIDOS EN UNA EMPRESA DE PRODUCTOS LÁCTEOS

ENEDY FARLEY GUARIN LIZARAZO

PROYECTO FINAL DE GRADUACIÓN PRESENTADO COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE MASTER EN GERENCIA
DE PROGRAMAS SANITARIOS EN INOCUIDAD DE ALIMENTOS

San José, Costa Rica
Mayo, 2018

UNIVERSIDAD PAR LA COOPERACIÓN INTERNACIONAL
UCI

Este Proyecto Final de Graduación fue Aprobado por la Universidad como requisito parcial para optar al grado de Máster en Gerencia de Programas Sanitarios en Inocuidad de Alimentos.

Giannina Lavagni

Profesor Tutor

Roy Wong

Lector N°1

Eneidy Farley Guarín Lizarazo

Sustentante

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a Dios por haberme dado la vida y las capacidades para salir adelante como persona, profesional, madre y esposa y porque me dio una nueva oportunidad para seguir viviendo y compartiendo con mi familia y todas las personas maravillosas que me han apoyado en forma incondicional. Dios también me concedió un gran esposo y un hermoso hijo, como la más bella expresión de amor y milagro de vida que han sido mi mayor tesoro y fuerza para salir adelante a pesar de las dificultades, sin su apoyo no lo hubiera podido lograr. Los Amo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser el gran artífice de mi vida, por haberme dado una nueva oportunidad de vivir, por ser mi fortaleza, mi luz, mi esperanza, mi guía.

A mis padres por haberme formado y hacer de mí la persona que soy, especialmente a mi Madre por su constante apoyo.

A mi esposo, por su apoyo incondicional durante esta etapa de mi vida y a mi hijo por ser el motor que me impulsa a salir adelante y lograr mis metas para ser cada día mejor.

A la empresa para la cual trabajo por abrirme las puertas laboralmente y por haberme permitido adquirir experiencia y crecer como profesional.

A mis profesores de la U por la formación académica, especialmente a mis Tutores por su orientación y enseñanzas.

Impacto de la presencia de *Bacillus sporothermodurans* en lotes de leche UHT producidos en una empresa de productos lácteos de Colombia.

Eneidy Farley Guarín Lizarazo. Estudiante Maestría Gerencia en Programas Sanitarios en Inocuidad de Alimentos. Universidad para la Cooperación Internacional. Costa Rica. Cel: +57 300201432. Email: enedyfarleygl07@gmail.com

RESUMEN

La presencia de esporas termorresistentes de *Bacillus sporothermodurans* en leche UHT ha despertado gran interés en el sector lácteo por determinar las fuentes de contaminación y plantear acciones correctivas enfocadas en su eliminación o reducción puesto que su presencia afecta los resultados de esterilidad comercial y la estabilidad del producto en su vida útil, generando grandes pérdidas económicas para la compañía que se ve expuesta a sanciones por parte de los entes de vigilancia y control. Este estudio está enfocado en evaluar el impacto de la presencia de *Bacillus sporothermodurans* en lotes de leche ultra pasteurizada (UHT) entera y deslactosada producida en una empresa de productos lácteos durante el año 2017 mediante la comparación y análisis de los resultados microbiológico, fisicoquímico y sensorial de muestras de leche UHT al término su vida útil, además de identificar los factores asociados a la calidad de la materia prima y a la contaminación de la leche UHT en el proceso que inciden en la calidad e inocuidad del producto. Se tabularon y analizaron los resultados de 423 muestras de lotes de leche UHT entera y 213 muestras de lotes de leche UHT deslactosada producidos en el año 2017, mediante el método de análisis estadístico de varianza (ANDEVA) con el fin de concluir si las variables de pH, sabor y color son estadísticamente diferentes con los lotes que reportaron esterilidad comercial no satisfactoria por presencia de *B.sporothermodurans* en comparación con los lotes que no fueron afectados por la presencia del microorganismo. Se determinó que existe suficiente evidencia estadística para asegurar con el 99% de confianza que la presencia del bacilo afecta significativamente las variables de pH, sabor y color para leche UHT entera. Para leche UHT deslactosada se determinó con el 99% de confianza que la presencia del bacilo afecta la variable de pH y con el 95% se afecta la variable de color. Se puede concluir que la presencia de *Bacillus sporothermodurans* en leche UHT entera y deslactosada impacta significativamente en las variables de pH y color al final de la vida útil del producto desmejorando sus características de calidad.

Palabras clave: *Bacillus sporothermodurans*, leche, impacto, UHT.

ABSTRACT

The presence of heat-resistant spores of *Bacillus sporothermodurans* in UHT (Ultra High Temperature) milk has aroused great interest in the dairy sector to determine the sources of contamination and propose corrective actions focused on its elimination or reduction since its presence affects the results of commercial sterility and stability of the product in its useful life, generating great economic losses for the company that is exposed to sanctions by the entities of surveillance and control. This study is focused on evaluating the impact of the presence of *Bacillus sporothermodurans* in lots of ultra-pasteurized (UHT) whole and lactose-free milk produced in dairy products company during the year 2017 by comparing and analyzing the microbiological, physicochemical and sensorial results of samples of UHT milk at the end of its useful life, in addition to identifying the factors associated with the quality of the raw material and the contamination of UHT milk in the process that affect the quality and safety of the product. The results of 423 samples of batches of whole UHT milk and 213 samples of batches of UHT lactose-free milk produced in 2017 were analyzed by the statistical analysis of variance (ANOVA) method in order to conclude whether the variables of pH, flavor and color are statistically different with the lots that reported unsatisfactory commercial sterility, due to the presence of *B. sporothermodurans* in comparison with the lots that were not affected by the presence of the microorganism. It was determined that there is enough statistical evidence to ensure with 99% confidence that the presence of the bacillus significantly affects the pH, taste and color variables for whole UHT milk. For UHT lactose-free milk, 99% confidence was determined that the presence of the bacillus affects the pH variable and with 95% the color variable is affected. It can be concluded that the presence of *Bacillus sporothermodurans* in UHT Whole and lactose-free milk has a significant impact on the pH and color variables at the end of the product's useful life, diminishing the quality characteristics.

Key words: *Bacillus sporothermodurans*, milk, impact, UHT.

INTRODUCCION

La Industria láctea se ha visto enfrentada a grandes exigencias legales y del mercado por cuanto la leche es catalogada como un alimento completo y a su vez de alto riesgo en inocuidad. La obtención de leche cruda de alta calidad es necesaria para evitar pérdidas económicas por producto que no alcanza el grado de calidad exigida por los consumidores (Buzby y Hyman, 2012), por lo tanto los esfuerzos a nivel industrial deben estar enfocados en mejorar la calidad microbiológica de la materia prima desde la producción primaria mediante la implementación de Buenas Prácticas de Ordeño (BPO), procedimientos de limpieza y desinfección, control de adulterantes y contaminantes y capacitación al productor primario. La alimentación con ensilaje incrementa los recuentos de esporulados en las épocas de utilización de los mismos por lo tanto su empleo para intensificar la producción lechera constituye un riesgo para la presencia de estos microorganismos (Vissers et al., 2007). *Bacillus sporothermodurans*, es un microorganismo esporulado que se detectó por primera vez en leche UHT en Italia y Austria en 1985 y luego en Alemania en 1990 (Hammer y col., 1995). Recientemente Herman y col., (2000) encontraron esta especie en leche esterilizada y otros productos lácteos como la leche UHT, leche con chocolate, leche evaporada y leche reconstituida. Esta especie puede proceder de diferentes orígenes como suelo, compost, tracto digestivo de los animales, estiércol, ubre, utensilios de ordeño y alimentación del animal, es difícil de aislar en cultivos microbiológicos convencionales y su detección debe realizarse en agar Brain Heart Infusion (BHI) después de calentar la muestra a 100°C durante 30 a 40 minutos (Sheldeman y col., 2006). La confirmación de *B.sporothermodurans* se puede hacer por PCR por análisis de secuencias amplificadas del gen 16s rRNA. (Pettersen y col., 1996). La presencia de esta especie de bacilo ha cobrado importancia ya que puede producir esporas que posteriormente pueden germinar durante el almacenamiento de la leche UHT degradando el producto debido a su acción proteolítica (Klijn y col., 1997; Montanari y col., 2004) impactando en la calidad y vida útil del producto. Aunque la mayoría de autores coinciden en que la principal fuente de contaminación de este microorganismo es la materia prima, también se han descrito casos asociados a producto contaminado en la planta de procesamiento (Hemmer y col., 1995). El tratamiento térmico de esterilización UHT utiliza un rango de temperatura de 135 °C a 150°C durante un corto tiempo, por 2 a 3 segundos (Comité del Codex sobre la Leche y Productos Lácteos, 2000). Este proceso garantiza la eliminación de las células vegetativas y de esporas presentes en la leche cruda, sin embargo las esporas del *B.sporothermodurans* tienen alta resistencia a este tipo de tratamiento térmico y para que se pueda eliminar se requiere de 3.4 a 7.9 segundos y temperaturas de 140 grados Celsius (Huemer y col., 1998). El incremento de estas variables durante el tratamiento térmico podría producir desnaturalización de las proteínas, isomerización de lactosa y reacciones

de Maillard, por lo tanto no es conveniente aplicarlo. En Colombia entre los años 2010 y 2011 se ha incrementado la incidencia de leches UHT con resultados de prueba de esterilidad comercial no satisfactoria por presencia de *B.sporothermodurans*, lo que se traduce en pérdidas económicas por decomiso y descarte de lotes afectados por parte de los entes de vigilancia y control como el Instituto de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) en cumplimiento a lo contemplado en el Decreto 616 de 2006 del Ministerio de Salud y Protección Social. El presente trabajo está enfocado en evaluar el impacto de la presencia de *Bacillus sporothermodurans* en lotes de leche ultra pasteurizada (UHT) Entera y Deslactosada producida en una empresa de productos lácteos de Colombia durante el año 2017 mediante la comparación y análisis de los resultados microbiológicos, fisicoquímicos y organolépticos de muestras de leche UHT al término su vida útil, además de identificar los factores asociados a la calidad de la materia prima y a la contaminación de la leche UHT en el proceso que inciden en la calidad e inocuidad del producto con el fin de plantear acciones de mejora en la obtención de la materia prima y en los procesos productivos para reducir o eliminar el número de lotes afectados y mayores pérdidas económicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tabularon los datos de los resultados obtenidos del análisis fisicoquímico y sensorial de esterilidad comercial de lotes de leche UHT Entera y Deslactosada producidos durante el año 2017 en la empresa.

Para el análisis de datos también se tuvo en cuenta los resultados de análisis microbiológico (recuento de mesófilos aerobios y recuento de esporas aerobias) de leche cruda y leche termizada almacenada en tanques con el fin de determinar la relación entre la calidad de la materia prima y la vida útil de producto.

Tamaño de muestra

Se tomaron en cuenta los lotes de leche UHT analizados por el laboratorio Fisicoquímico al final de la vida útil para un total de 423 lotes de leche Entera y 213 lotes de leche Deslactosada con o sin presencia de *Bacillus sporothermodurans* obtenidos durante el año 2017.

Metodología

Se aplicó como herramienta estadística un análisis de varianza (ANDEVA) para establecer el grado de correlación entre las variables analizadas para los lotes de leche UHT Entera y Deslactosada producidos durante el año 2017 estableciendo las siguientes condiciones preliminares:

VARIABLES INDEPENDIENTES: Presencia o ausencia de BS

Variables dependientes: pH, color, sabor

Hipótesis nula: Todas las muestras son iguales. Las medias de los resultados de las muestras de leche con presencia de bacilo y sin presencia son iguales, no hay diferencia entre sus valores por la presencia del microorganismo.

Hipótesis alterna: Al menos una muestra es diferente. Los promedios de los valores son diferentes, la presencia del bacilo incide en los resultados.

Nivel de significancia Leche Entera: $\alpha = 0,01$

Nivel de significancia Leche Deslactosada: $\alpha = 0,01$ y $0,05$ Dado que las variables de sabor y color son categóricas se realizó una codificación numérica sin que ella indicara la multiplicación del efecto en los diferentes niveles con el fin de poder realizar el procesamiento de los datos en el programa. A continuación se relaciona la codificación establecida:

Tabla 1. Codificación presencia de BS

Presencia del Bacilo (BS)		
Niveles	No	Si
Codificación	0	1

Tabla 2. Codificación variable Sabor

Sabor			
Niveles	Característico	Acido Leve	No característico
Codificación	1	2	3

Tabla 3. Codificación variable Color

Color			
Niveles	Blanca	Rosa tenue	Rosa
Codificación	1	2	3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis microbiológico de leche cruda y leche almacenada en tanques

Según resultados de análisis microbiológico de leche cruda realizados durante los años 2016 y 2017 para identificar la presencia de esporas termorresistentes en leche cruda se encontraron 5 de 23 centros de acopio con la presencia de *B.sporothermodurans*. Teniendo en cuenta que éstos centros de acopio entregan el mayor volumen de materia prima a la planta de proceso de leche su calidad microbiológica impacta significativamente en la estabilidad del producto y la presencia de esporas termorresistentes en esta leche hace más difícil su eliminación en la planta con los procedimientos de limpieza y desinfección CIP (Cleaning In Place) establecidos para el saneamiento de la línea de proceso.

En el año 2016 de las 94 muestras analizadas de leche cruda provenientes de todos los centros de acopio, 34 presentaron crecimiento microbiano presuntivo de esporas de *Bacillus sporothermodurans*

En el año 2017 de las 80 muestras analizadas, 20 presentaron crecimiento presuntivo de *Bacillus sporothermodurans* y otras especies de Bacilos termorresistentes: *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis* en leche cruda proveniente de los 3 principales centros de acopio que entregan el mayor volumen de leche a la planta.

Según resultados de análisis microbiológico realizados de junio a diciembre de 2017 para leche cruda almacenada en tanques proveniente de diferentes centros de acopio se obtuvo en promedio de 50% de recuento de esporas aerobias y en tanques de leche termizada entera y deslactosada un recuento promedio de 39% demostrando que después del tratamiento térmico de termización realizado entre 68°C y 70°C durante 20 segundos hay sobrevivencia de esporas del género *Bacillus* (Figura 1).

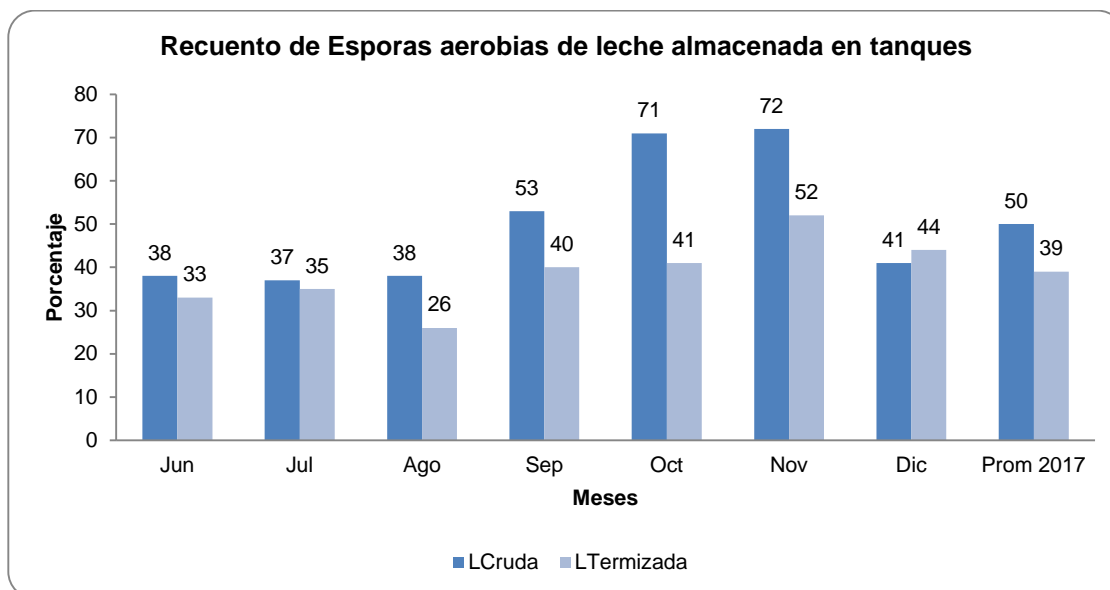


Figura 1. Porcentaje de esporas aerobias en tanques de leche cruda y termizada

Análisis de datos de resultados microbiológicos de producto terminado: leche ultrapasteurizada UHT Entera y Deslactosada

Se analizó la base de datos de resultados de esterilidad comercial de producto terminado obtenidos de enero a diciembre de 2017 por medio del equipo MLS II (Sistema de Luminiscencia Microbiano II) y por la técnica de recuento en placa en Agar infusión cerebro-corazón (BHI) para identificar el porcentaje de lotes con la presencia del microorganismo termorresistente, *Bacillus sporothermodurans*.

Según los resultados de análisis microbiológico de esterilidad comercial de producto terminado se puede concluir que de los 1124 lotes de leche producidos de enero a diciembre de 2017 el 50% de ellos presentaron crecimiento presuntivo de *B.sporothermodurans*.

Análisis Estadístico de Leche UHT Entera

Con el objeto de determinar estadísticamente la relación entre la presencia de la sabor y color al final de la vida útil del producto, se analizaron los resultados de 423 muestras de leche mediante el método de análisis estadístico de varianza (ANDEVA) con el fin poder concluir si las variables de pH, sabor, y color son estadísticamente diferentes en los lotes con esterilidad comercial no satisfactoria

por presencia del bacilo BS con respecto a los lotes que presentan esterilidad comercial satisfactoria donde no se encuentra la presencia de este.

Análisis de resultados: Se aplicaron diferentes análisis de varianza con un nivel de confianza del 0.01 para la determinación de la incidencia de la variable de esterilidad comercial con la presencia del bacilo (BS) en las variables de pH, sabor y color obteniéndose los siguientes resultados:

BS vs pH leche entera UHT

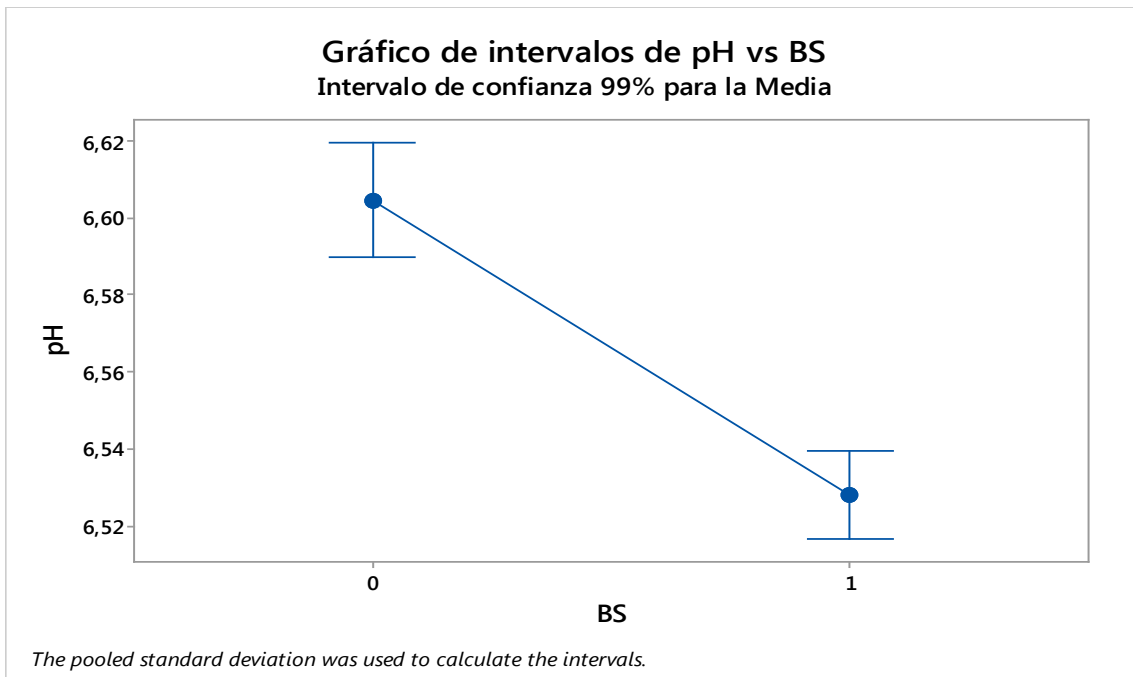


Figura 2. Intervalos de pH vs BS leche entera

Tabla 4. Análisis de varianza leche entera. Programa Minitab

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
BS	1	0,5732	0,573228	112,37	0,000
Error	421	2,1476	0,005101		
Total	422	2,7208			

Con un 99% de confianza es posible afirmar que la presencia del Bacilo (BS) tiene una incidencia en la variable de pH, puesto que el valor P (0.000) es menor a 0.01. Como se observa en la Figura 2, la presencia del bacilo se relaciona directamente con una disminución en los valores del pH. En cuanto a las gráficas de residuales que se encuentra en los anexos se puede observar que se cumple

el supuesto de normalidad por lo que se puede confiar fielmente en los resultados de la prueba.

BS vs Sabor leche entera UHT

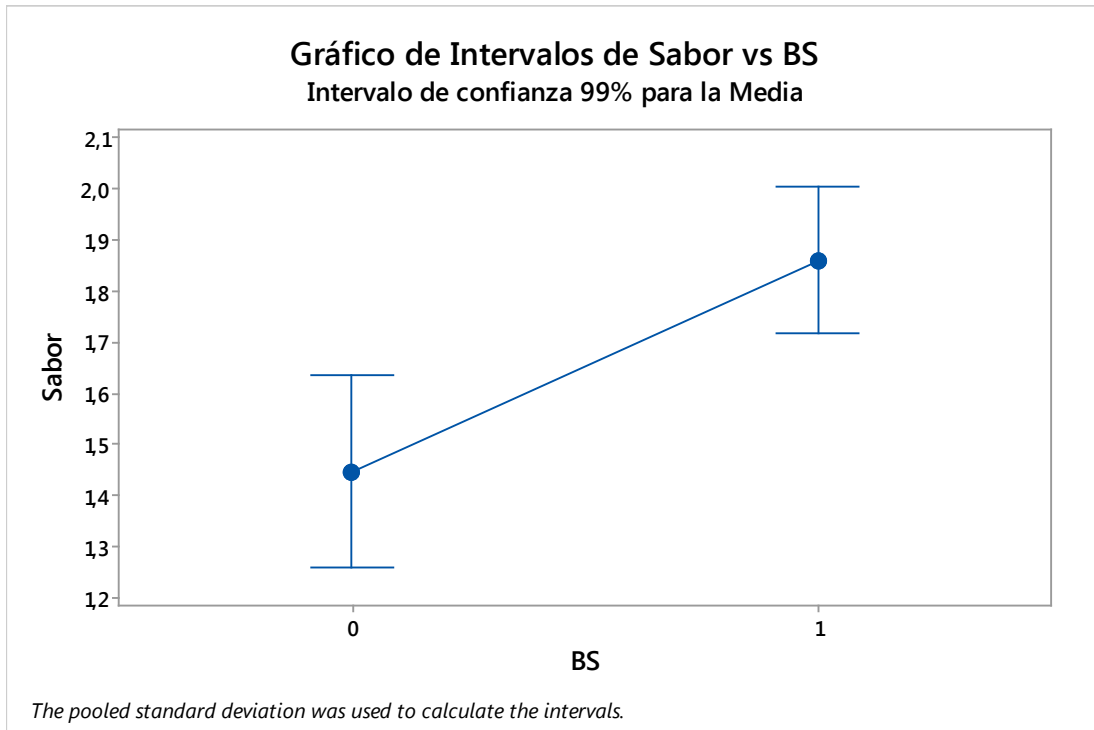


Figura 3. Intervalos de Sabor vs Bacilo BS leche entera

Tabla 5. Análisis de Varianza leche Entera. Programa Minitab

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
BS	1	16,82	16,8180	20,58	0,000
Error	421	344,00	0,8171		
Total	422	360,81			

Con una confianza del 99% es posible afirmar que la presencia del bacilo (BS) tiene una incidencia sobre el sabor de las muestras, puesto que el valor P (0.000) es menor a 0.01. Como se observa en el Figura 3, la presencia del bacilo se relaciona en gran medida con sabores No característicos.

BS vs Color leche entera UHT

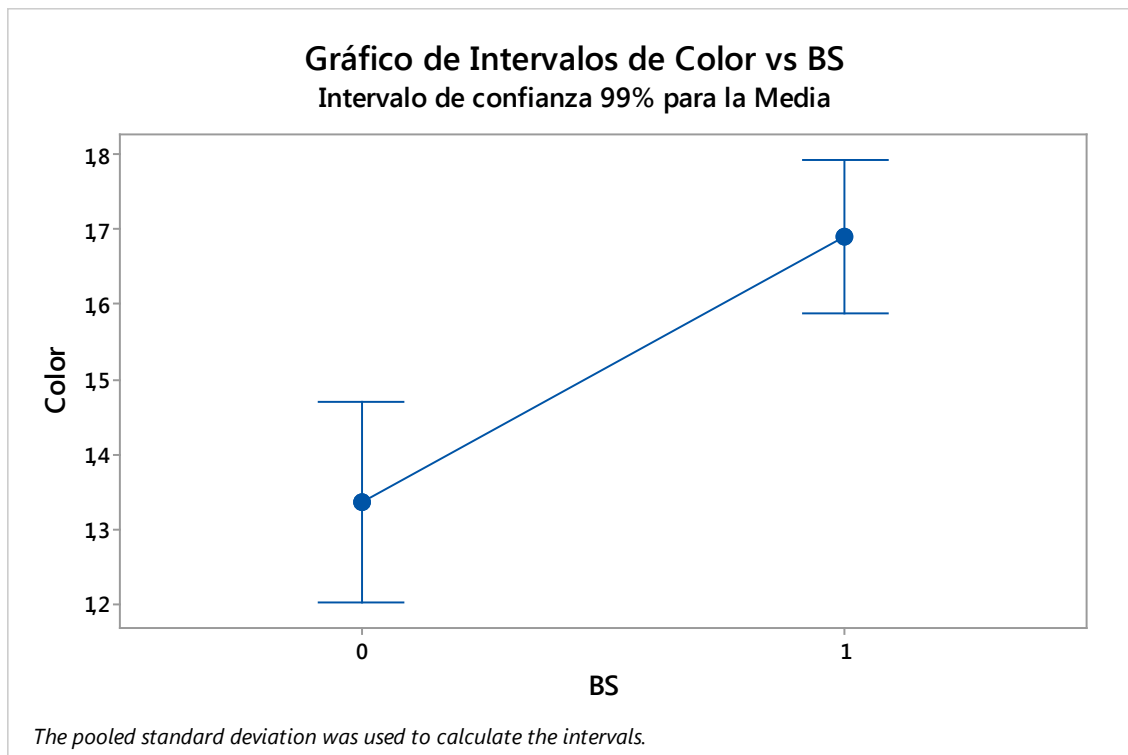


Figura 4. Intervalos de Color vs Bacilo BS leche entera

Tabla 6. Análisis de Varianza leche Entera. Programa Minitab

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
BS	1	12,26	12,2579	29,69	0,000
Error	421	173,83	0,4129		
Total	422	186,09			

Con una confianza del 99% es posible afirmar que la presencia del bacilo (BS) tiene una incidencia sobre el color de las muestras, puesto que el valor P (0.000) es menor a 0.01. Como se observa en la Figura 4, la presencia del bacilo se relaciona en gran medida con colores No característicos.

Una vez realizado el análisis se determinó que existe suficiente evidencia estadística para asegurar con el 99% de confianza que la presencia del bacilo afecta significativamente las variables de pH, sabor, y color. En todos los casos dicha presencia desmejora en gran medida las propiedades de la leche haciendo que se obtengan valores de pH predominantemente bajos, y sabores y colores no característicos.

Análisis Estadístico Leche UHT Deslactosada

Con el objeto de determinar estadísticamente la relación entre la presencia de la espora del bacilo (BS) y los cambios de las variables pH, sabor y color al final de la vida útil de la leche deslactosada, se analizaron los resultados de 213 muestras de leche mediante el método de análisis de varianza (ANDEVA). Con el fin de concluir si las variables pH, sabor y color son estadísticamente diferentes en los lotes con esterilidad comercial satisfactoria donde no se encuentra la presencia de éste.

Análisis realizados: Se aplicaron diferentes análisis de varianza ANDEVA con un nivel de confianza del 0.01 para la determinación de la incidencia de la variable de esterilidad satisfactoria (BS) en la variable de pH y con un nivel de significancia del 0.05 para las variables de sabor y color obteniendo los siguientes resultados:

BS vs pH leche Deslactosada

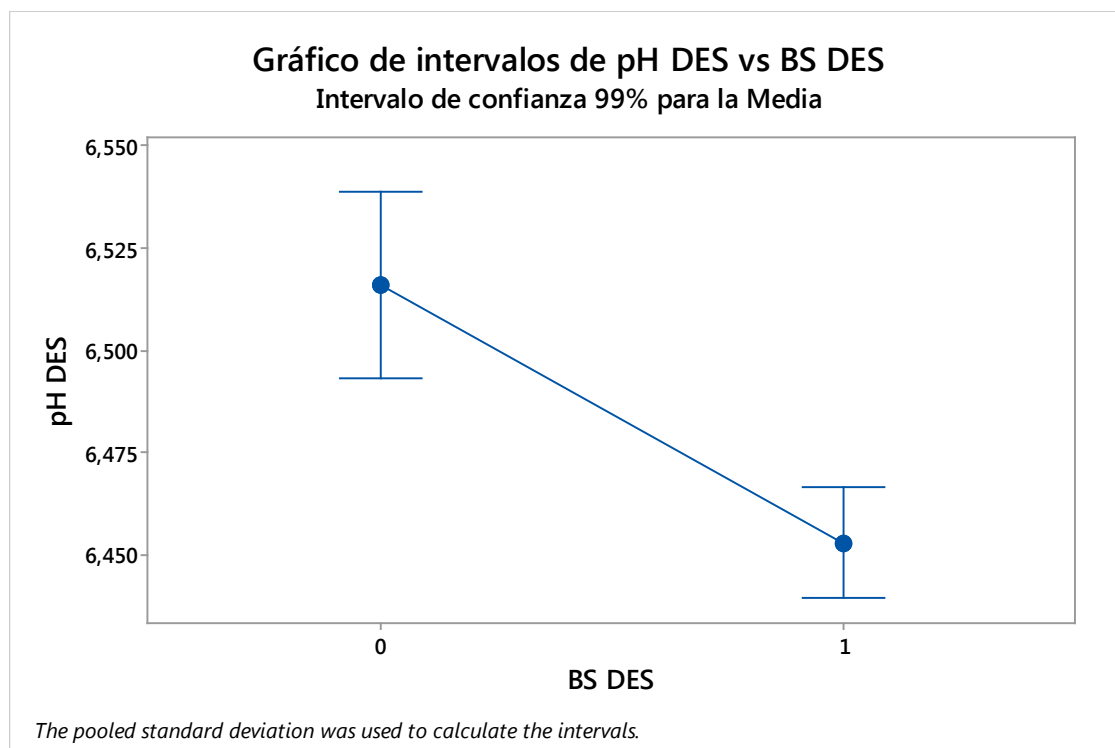


Figura 5. Intervalos pH vs BS leche Deslactosada

Tabla 7. Análisis de Varianza leche Deslactosada. Programa Minitab

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
BS DES	1	0,1652	0,165235	38,03	0,000
Error	212	0,9210	0,004345		
Total	213	1,0863			

Con un 99% de confianza es posible afirmar que la presencia del Bacilo (BS) tiene una incidencia en la variable pH, esto dado a que el valor P (0.000) es menor a 0.01. Adicionalmente como se puede observar en la Figura 5, la presencia del Bacilo se relaciona con la disminución en el pH de las muestras. En cuanto a las gráficas de residuales que se encuentra en los anexos se puede observar que se cumple el supuesto de normalidad por lo que se puede confiar en los resultados de la prueba.

BS vs Sabor leche Deslactosada

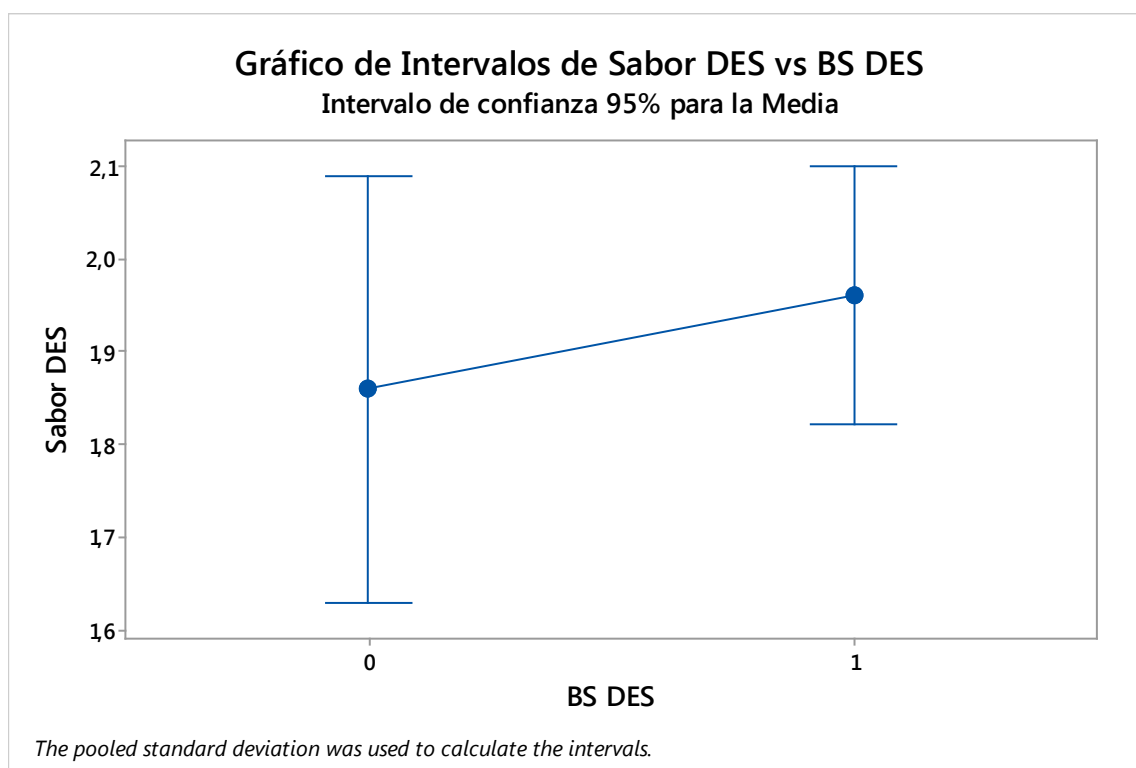


Figura 6. Intervalos Sabor vs BS leche Deslactosada

Tabla 8. Análisis de Varianza leche Deslactosada. Programa Minitab.

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
BS DES	1	0,436	0,4362	0,56	0,454
Error	212	164,648	0,7766		
Total	213	165,084			

Con un 95% de confianza no es posible afirmar que la presencia del Bacilo (BS) tenga una incidencia en el sabor de la muestra, esto dado a que el valor p

(0.454) es mayor a 0.05. Aunque no fue posible encontrar suficiente evidencia estadística para determinar que existe diferencia entre las medias, al observar la distribución se observa en la Figura 6, que el límite inferior del intervalo de confianza de la media para las muestras con bacilo (1.8231), es superior al límite inferior del intervalo de confianza de la media para las muestras sin bacilo (1.630), lo cual puede indicar una posible tendencia a que la presencia del bacilo afecte el sabor de la muestra. Se recomienda el diseño de un experimento con la realización de bloques para determinar si fue un error en toma de datos, o que hay variables que estén incluyendo ruido estadístico a los datos tomados.

BS vs Color leche Deslactosada

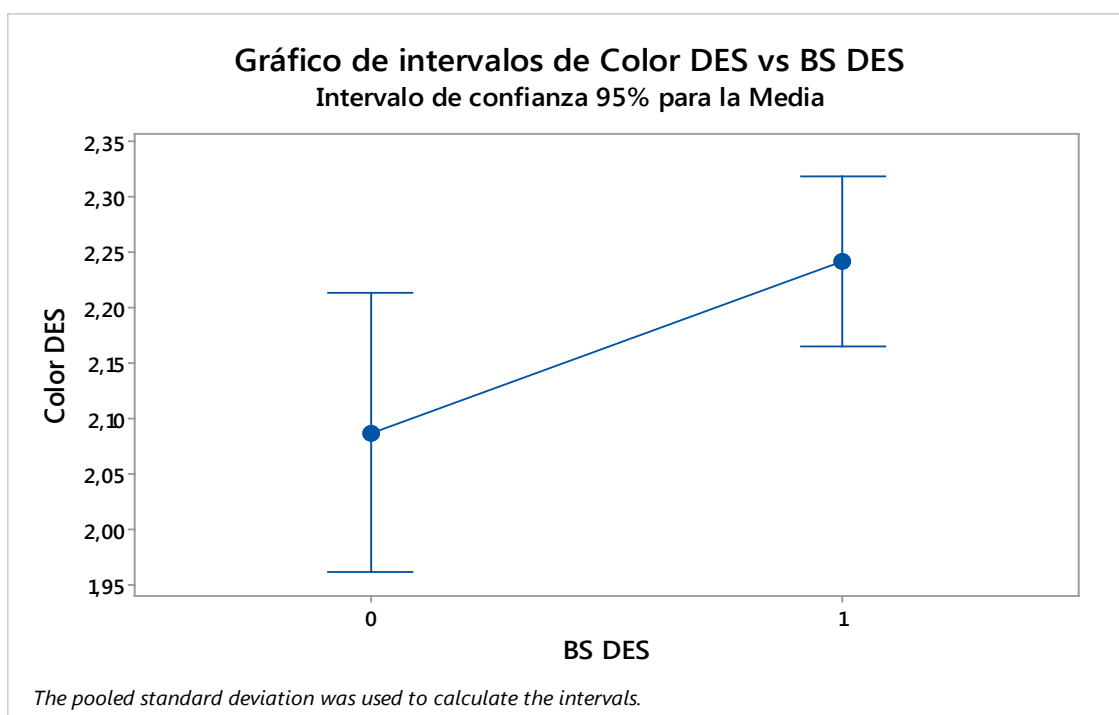


Figura 7. Intervalos Color vs BS leche Deslactosada

Tabla 9. Análisis de Varianza leche Deslactosada. Programa Minitab

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
BS DES	1	0,9959	0,9959	4,28	0,040
Error	212	49,3640	0,2328		

Con un 95% de confianza es posible afirmar que la presencia del Bacilo (BS) tiene una incidencia en la variable Color, esto dado a que el valor P (0.040) es menor a 0.05. Como se observa en la Figura7, existe una tendencia de las muestras con presencia del bacilo (BS) a presentar colores No característicos.

Una vez realizado el análisis se determinó que existe suficiente evidencia estadística para asegurar con el 99% de confianza que la presencia del bacilo afecta significativamente la variable de pH, obteniendo valores predominantemente bajos del mismo. Asimismo, se puede concluir con un 95% de confianza que la presencia del bacilo afecta la variable color, obteniendo predominantemente valores no característicos en presencia del bacilo; finalmente no se pudo hallar suficiente evidencia estadística para determinar una relación entre la presencia del bacilo y cambios en sabor, sin embargo, se obtuvo una amplia desviación estándar en las muestras sin bacilo, lo cual puede indicar que puede ser necesario repetir mediciones y mejorar el sistema de captura de datos o evaluar otras variables relacionadas con la calidad de la materia prima o del proceso que estén incidiendo en los resultados.

CONCLUSIONES

1. Se pudo demostrar estadísticamente que la presencia del microorganismo *Bacillus sporothermodurans* en lotes de leche UHT Entera producidos durante el año 2017 se correlaciona significativamente con la afectación de las variables de pH, color y sabor al final de la vida útil y para leche Deslactosada con las variables de pH y color del producto afectando sus características de calidad.
2. La presencia de esporas de *Bacillus sporothermodurans* afectó el 50% de los lotes de leche UHT Entera y Deslactosada producidos en el año 2017 con resultados de esterilidad comercial no satisfactorios representando un incumplimiento legal a la normativa Colombiana exponiendo la empresa a pérdidas económicas y sanciones legales impuestas por los entes de vigilancia y control.
3. En el análisis microbiológico de leche cruda proveniente de Centros de Acopio realizados en el año 2016 y 2017 se identificó los proveedores de leche cruda que presentaron recuentos de esporas de *Bacillus sporothermodurans* incidiendo en los recuentos microbiológicos de la leche termizada almacenada en tanques y en producto terminado por la sobrevivencia del microorganismo a los tratamientos térmicos de termización y ultrapasteurización UHT.

RECOMENDACIONES

1. Se debe implementar un plan de acción que permita reducir la carga microbiana de la leche cruda proveniente de los centros de acopio que presentan recuentos de *Bacillus sporothermodurans* fomentando en los proveedores de leche cruda la aplicación de Buenas prácticas de higiene en el ordeño, manejo adecuado de alimentación animal, mejora en el diseño y condiciones sanitarias de los sitios de ordeño con el fin de mejorar la vida útil del producto.

2. Se hace necesario implementar un plan de choque con sustancias desinfectantes diferentes a las manejadas actualmente en el sistema CIP de la línea de leche UHT que permita eliminar la presencia de biofilms en la tubería puesto que éstos favorecen la resistencia al tratamiento térmico de microorganismos esporulados que pueden aparecer en producto terminado.

3. Dada la problemática a la que se enfrenta la industria láctea con la presencia de *B. sporothermodurans* que afecta los resultados de esterilidad comercial de leche UHT, se hace indispensable participar activamente en las mesas de concertación nacional con otras empresas del sector lácteo, el Ministerio de salud y protección social y entes de vigilancia y control sobre el establecimiento de límites permisibles para este microorganismo.

BIBLIOGRAFIA

1. Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Winn, W. 2008. 6 ed. *Koneman Diagnóstico Microbiológico*. Buenos Aires, Argentina: Editorial médica Panamericana.
2. Andersson, A., Ronner, U., Granum, P. E. (1995) What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium prefringens*? *Int. J. Food Microbiol.* c 28. p.145 - 155
3. Bernier, I., Cárdenas, E., Piñeros, O. (2012, junio). *Bacillus sporothermodurans* anaeróbico facultativo aislados de leches UHT elaboradas en Colombia. *Revista Asociación Colombiana de Ciencia y tecnología de alimentos. Alimentos hoy, volumen 21*(No 27).
4. Chambers, J.V. (2002). The microbiology of raw milk. In: R.K. Robinson (Ed.). *Dairy Microbiology Handbook*. John Wiley & Sons, New York. 3 ed. p.39-90
5. Comité del Codex sobre la Leche y Productos Lácteos, conjunto FAO/WHO Comité del Codex programa de normas alimentarias sobre la leche y productos lácteos. Wellington Nueva Zelanda 28 de febrero – 3 de marzo de 2000. Consultado 12 mzo 2018. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/x4888e/x4888e00.htm>.
6. Decreto 616 de 2006. [Ministerio de Protección Social]. Por el cual se expide el reglamento técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el

consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendo, importe o exporle en el país. Colombia. Febrero 28 de 2006.

7. Garde, S., Avila, M., Arias, R., Gaya, P., Nuñez, M. (2011). Outgrown inhibition of *Clostridium beijerinckii* spores by bacteriocin-producing lactic culture in ovine milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, c.150, p.59-65.
8. Hanson, M.L., Wendorff, W.L., Houk, K.B. (2005). Effect heat treatment of milk on activation of *Bacillus* spores. *Journal of Food Protection*, c.68, p.1484 – 1486.
9. Hammer, P., Lembke, F., Suhren, G., Heeshen, W. (1995). Characterization of a heat resistant mesophilic *Bacillus* species affecting quality of UHT milk a preliminary report. *Kieler Milchwirtschaft Forschungsberichte*, c.47, p.303 – 311.
10. Herman, L., Heyndrickx, M., Vaerewijck, M., Klijn. (2000) *Bacillus sporothermodurans* – a *Bacillus* forming highly heat-resistant spores. 3. Isolations and methods of detection. *Bull Int Dairy Federation*, c.357, p.9-14.
11. Huemer, I. A., Klijn, N., Vogelsang, H. W. J., Langeveld, L. P. M. (1998) Thermal death kinetics of spores of *Bacillus sporothermodurans* isolated from UHT milk. *Int. Dairy J.* c.8, p.851-855.
12. Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D.A. (2005) Milk, fermentation, and fermented and nonfermented dairy products. In: *Modern food microbiology* (7 ed). New York, Springer Science. p.155-160.
13. Klijn, N., Herman, L., Langeveld, L., Vaerewijck, M., Wagendorp, A., Huemer, I. Weerkamp, A. (1997). Genotypical and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans* strains, surviving UHT sterilization. *International Dairy Journal*, c.7, p.421-42.
14. Moreno R. Eliana. (2011) Evaluación de microorganismos termodúricos y principales fuentes de contaminación en el tambo. Montevideo Uruguay.
15. Minitab 18. Análisis de varianza ANOVA. Consultado 2 mzo. 2018. Disponible en <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/supporting-topics/basics/what-is-anova/>
16. 3M. (2011). *Seguridad alimentaria. Sistema luminiscencia microbiano (MLS II)*. España. Consultado 12 feb. 2018. Disponible en http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/MLS_II.pdf.

17. Pettersson, B., Lembke, F., Hammer, P., Stackebrandt, Priest, F. G., (1996) *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. *Int. J. Syst. Bacteriol.* c. 46 p. 759
18. Scheldeman, P., Herman, L., Foster, S., Heyndrickx, M. (2006) *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. *J. Appl. Microbiol.* c.101, p. 542-555.
19. Vaerewijck, M. J., De Vos, P., Lebbe, L., Scheldeman, P., Hoste, B., Heyndrickx, M. (2001) Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle. *J. Appl. Microbiol.* c.91, p.1074 - 1084
20. Vissers, M.M., Driehuis, F., Giffel, M.C.T., Jong P.D., y Lankveld, J.M.G (2007). Concentration of butyric acid bacteria spores in silage and relationships with aerobic deterioration. *Journal of Dairy Science*, c. 90, p.928 -936

ANEXOS

Anexo 1. ACTA (CHARTER) DEL PROYECTO FINAL DE GRADUACIÓN (PFG)**Nombres y apellidos:** Eneidy Farley Guarín Lizarazo**Lugar de Residencia:** Colombia**Institución:** Empresa de Productos Lácteos S.A.S**Cargo/puesto:** Jefe Control de Calidad

Información Principal y autorización del PFG	
Fecha: Enero 29 de 2018	Nombre de Proyecto: Impacto de la presencia de <i>Bacillus sporothermodurans</i> en lotes de leche ultra pasteurizada (UHT) producida en una empresa de lácteos de Colombia durante el año 2017
Fecha de inicio del proyecto: Enero 29 de 2018	Fecha tentativa de finalización del proyecto: Marzo 21 de 2018
Tipo de PFG (Tesina/artículo)	Artículo
Objetivos del proyecto (general y específicos)	
<p>Objetivo general</p> <p>Evaluar el impacto de la presencia de <i>B. sporothermodurans</i> en lotes de leche ultra pasteurizada (UHT) entera y deslactosada producidos en la empresa de productos lácteos durante el año 2017</p> <p>Objetivos específicos</p> <p>Comparar los resultados de análisis microbiológico, fisicoquímico y sensorial de muestras de leche UHT y establecer la correlación entre las variables analizadas al final de la vida útil del producto.</p> <p>Identificar los factores asociados a la calidad de la materia prima y a la contaminación de la leche UHT en las etapas posteriores al tratamiento térmico de ultrapasteurización que impactan en la vida útil del producto.</p> <p>Determinar acciones de mejora en los procedimientos de limpieza y desinfección de la línea de proceso de leche UHT para la obtención de resultados de esterilidad comercial satisfactorios en producto terminado.</p>	
Descripción del producto	
<p>Durante los últimos años el sector lácteo ha tomado gran importancia en relación al tema de inocuidad puesto que la leche y sus derivados están catalogados como alimentos de alto riesgo en salud pública ya que por sus características de composición favorecen la proliferación microbiana haciéndolos más susceptibles al deterioro. Por lo tanto cualquier deficiencia durante la producción, almacenamiento,</p>	

distribución y comercialización puede representar un riesgo para la salud del consumidor acompañado de pérdidas económicas para la empresa.

La política sanitaria de la cadena láctea en Colombia contemplada en el documento Conpes 3675 de 2015 no sólo se ha enfocado en la economía nacional, en la generación de empleo, en la seguridad alimentaria sino que también se ha orientado en la inspección, vigilancia y control de la producción y comercialización de leche y derivados lácteos. Mediante el Decreto 616 de 2006 se establecen los requisitos que debe cumplir la leche para consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendia, importe o exporte en el país y en el Artículo 19 se establece que la leche UHT debe presentar resultados de esterilidad comercial satisfactoria o ausencia de crecimiento microbiano a 35 y 55 grados celsius (°C) después de 10 días de incubación.

Al realizar la evaluación del impacto de la presencia de microorganismos termorresistentes en lotes de leche UHT se busca proponer acciones de mejora relacionadas con la calidad de la materia prima y optimización del proceso que permita conservar la estabilidad del producto hasta el final de su vida útil, dando cumplimiento a los requisitos legales establecidos, minimizando el riesgo de posibles sanciones por parte de los entes de vigilancia y control y posibles pérdidas económicas y de imagen para la compañía.

Necesidad del proyecto

Dentro de la caracterización de la cadena láctea se reconocen los siguientes eslabones: proveedores, sistemas productivos, centros de acopio, industria y comercialización. Para este estudio, la investigación se centralizará en el análisis estadístico de resultados microbiológicos de leche UHT obtenidos en el año 2017 y su correlación con las variables fisicoquímicas y sensoriales analizadas al final de la vida útil del producto para determinar factores asociados a etapas del proceso que inciden en la calidad del producto terminado como la calidad microbiológica de la materia prima y los procedimientos de limpieza y desinfección de la línea de proceso.

A nivel nacional entre los años 2010 y 2011 se ha incrementado la incidencia de leches UHT con resultados de esterilidad comercial no satisfactorios por la presencia de bacterias termorresistentes tales como el *B. sporothermodurans* razón por la cual surge la necesidad de desarrollar esta investigación puesto que en la actualidad los lotes de leche UHT producidos en la planta también se han visto afectados por este grupo de microorganismos, incumpliendo lo establecido en la legislación colombiana bajo el Decreto 616 emitido en el año 2006 en el cual se exige resultados de esterilidad comercial satisfactorios en leche ultra pasteurizada larga vida.

Teniendo en cuenta que en la actualidad la empresa es líder en la región con 26 años de experiencia en el sector lácteo y con una penetración en los hogares del 78% con productos lácteos de calidad (Puntos de venta para el consumidor (CRP) por sus siglas en inglés) su responsabilidad con los clientes y consumidores en términos de inocuidad y calidad es cada día mayor y no puede exponerse a grandes pérdidas económicas, pérdida de imagen y credibilidad relacionadas con los productos que comercializa.

Justificación de impacto del proyecto

En Colombia el Plan Nacional de Desarrollo 2006 - 2010 *Hacia un Estado Comunitario: Desarrollo para Todos*, con el fin de consolidar el crecimiento y mejorar la competitividad del sector agropecuario indica que, además de alcanzar precios competitivos de los productos, se requiere mejorar el estatus sanitario del país, entendido como la capacidad para cumplir con las medidas sanitarias y fitosanitarias exigidas para acceder a cada mercado.

A pesar de las continuas mejoras que se realizan a los procesos de producción en la industria de alimentos en este caso en la industria láctea, el problema de leche UHT comercializada con resultados de esterilidades comerciales no satisfactorias y adulteradas con suero sigue aumentando sin control.

De acuerdo con los datos obtenidos de los muestreos realizados por los entes territoriales como Secretarías de Salud Departamental el número de producciones de leche UHT larga vida con resultados de esterilidad comercial no satisfactorios por bacterias termorresistentes se ha incrementado convirtiéndose en un problema nacional al cual se deben enfrentar las empresas del sector lácteo por el impacto económico que conlleva el decomiso y el descarte del producto. La empresa en su política, contempla su gran compromiso frente a la producción y comercialización de productos lácteos que cumplan los requisitos legales, de inocuidad y calidad que puedan satisfacer las necesidades de clientes y consumidores.

Sin embargo en los últimos años en relación con la producción de leche UHT ésta se ha visto enfrentada a microorganismos termorresistentes que han afectado los resultados de su esterilidad comercial por la presencia de *B. sporothermodurans*, catalogando el producto como no satisfactorio lo cual representa riesgo de decomiso y destrucción del producto generando pérdidas económicas importantes para la empresa.

Aunque el tratamiento térmico de ultrapasteurización, el proceso de envasado aséptico y la limpieza profunda de los equipos están diseñados para conservar el producto hasta el final de su vida útil sin afectar sus características de calidad e inocuidad la presencia de esporas termorresistentes inciden la estabilidad del producto y afectan los resultados de esterilidad comercial exigidos legalmente para este tipo de productos, generando grandes pérdidas económicas. Por lo tanto se hace relevante el desarrollo de este tema con el fin de implementar acciones de mejora que permitan obtener conformidad en los resultados de esterilidad comercial de leche UHT.

Restricciones

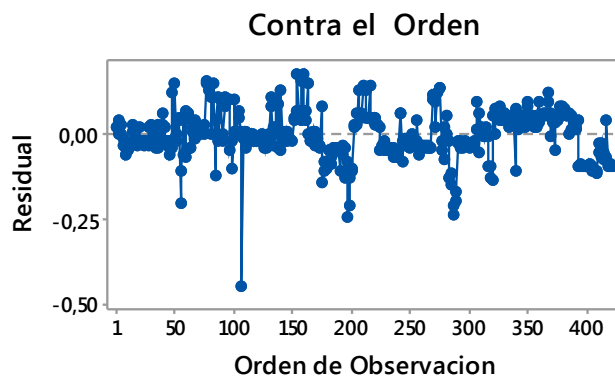
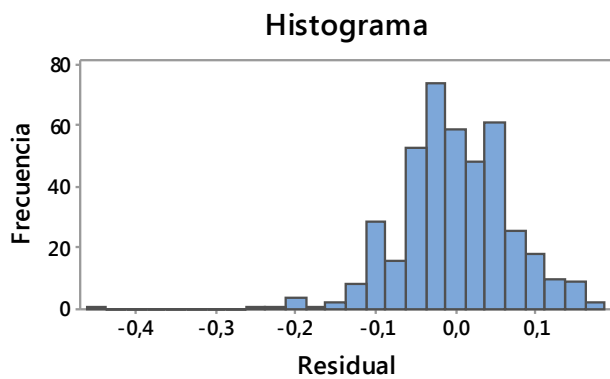
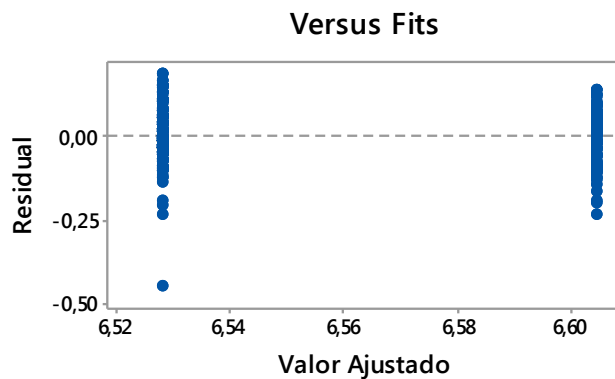
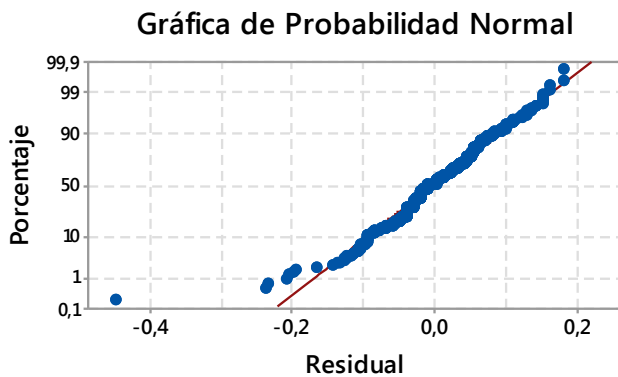
- Registro de resultados de análisis de lotes de leche UHT al final de la vida útil incompletos.
- Tiempo limitado para el análisis de la información de resultados fisicoquímicos y microbiológicos de lotes de leche UHT producidos en el año 2017.

Entregables: Avances del artículo a tutor (a). Entrega del documento final a tutor (a) y a lector (a), para su revisión y aprobación.	
Identificación de grupos de interés:	
Involucrados directo(s): Dirección de Producción; Fomento ganadero, Logística y Distribución	
Involucrados indirecto(s): Proveedores de sustancias químicas; Autoridades sanitarias nacionales (INVIMA); Secretaria de salud departamental; Asociaciones de la industria láctea y Consumidor	
Aprobado por Director MIA: Félix Modesto Cañet Prades	Firma:
Aprobado por: Giannina Lavagni	Firma:
Realizado por: Eneidy Farley Guarín Lizarazo	Firma:

Anexo 2. Resultados Análisis estadístico Leche UHT Entera (Programa Minitab)

One-way ANOVA: PH versus BS Leche Entera					
Method					
Null hypothesis	All means are equal				
Alternative hypothesis	At least one mean is different				
Significance level	$\alpha = 0,01$				
Equal variances were assumed for the analysis.					
Factor Information					
Factor	Levels	Values			
BS	2	0; 1			
Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
BS	1	0,5732	0,573228	112,37	0,000
Error	421	2,1476	0,005101		
Total	422	2,7208			
Model Summary					
	S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)	
	0,0714219	21,07%	20,88%	20,30%	
Means					
BS	N	Mean	StDev	99% CI	
0	154	6,60461	0,07417	(6,58972; 6,61950)	
1	269	6,52810	0,06981	(6,51684; 6,53937)	
Pooled StDev = 0,0714219					

Graficas de residuales para pH



One-way ANOVA: Sabor versus BS

Method

Null hypothesis All means are equal
 Alternative hypothesis At least one mean is different
 Significance level $\alpha = 0,01$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
BS	2	0; 1

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
BS	1	16,82	16,8180	20,58	0,000
Error	421	344,00	0,8171		
Total	422	360,81			

Model Summary

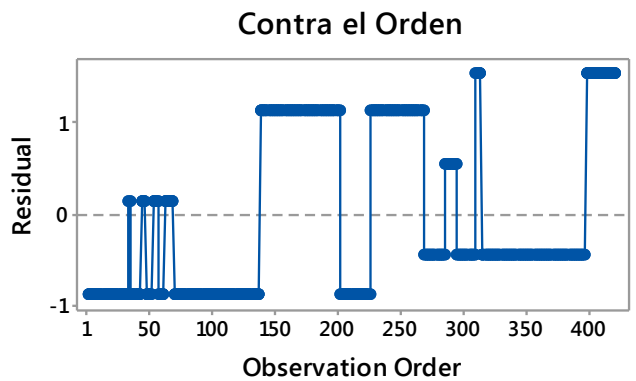
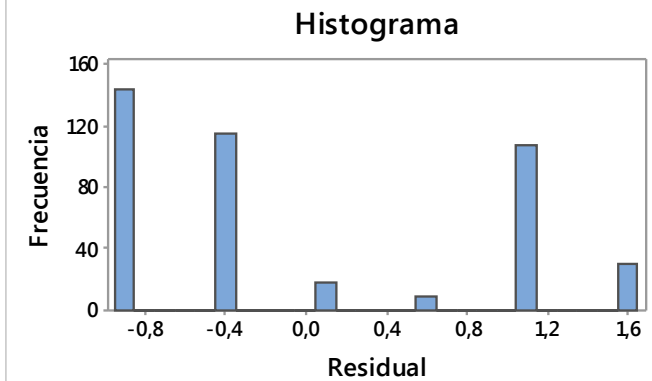
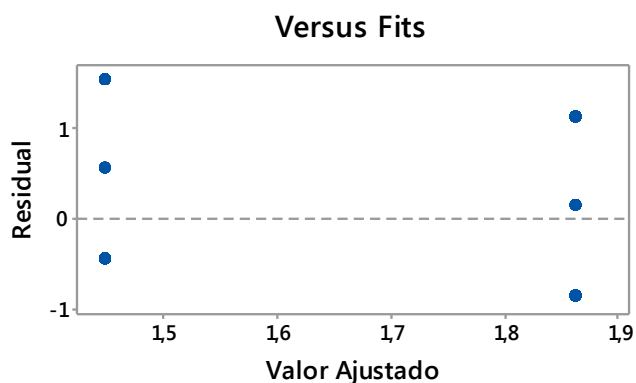
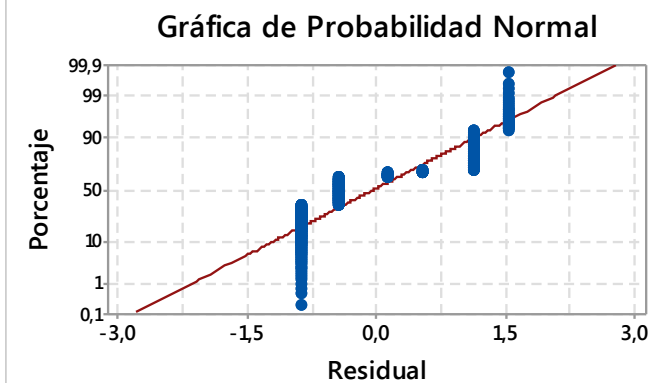
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,903931	4,66%	4,43%	3,80%

Means

BS	N	Mean	StDev	99% CI
0	154	1,4481	0,8007	(1,2596; 1,6365)
1	269	1,8625	0,9579	(1,7198; 2,0051)

Pooled StDev = 0,903931

Graficas de residuales para Sabor



One-way ANOVA: Color versus BS

Method

Null hypothesis All means are equal
 Alternative hypothesis At least one mean is different
 Significance level $\alpha = 0,01$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
BS	2	0; 1

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
BS	1	12,26	12,2579	29,69	0,000
Error	421	173,83	0,4129		
Total	422	186,09			

Model Summary

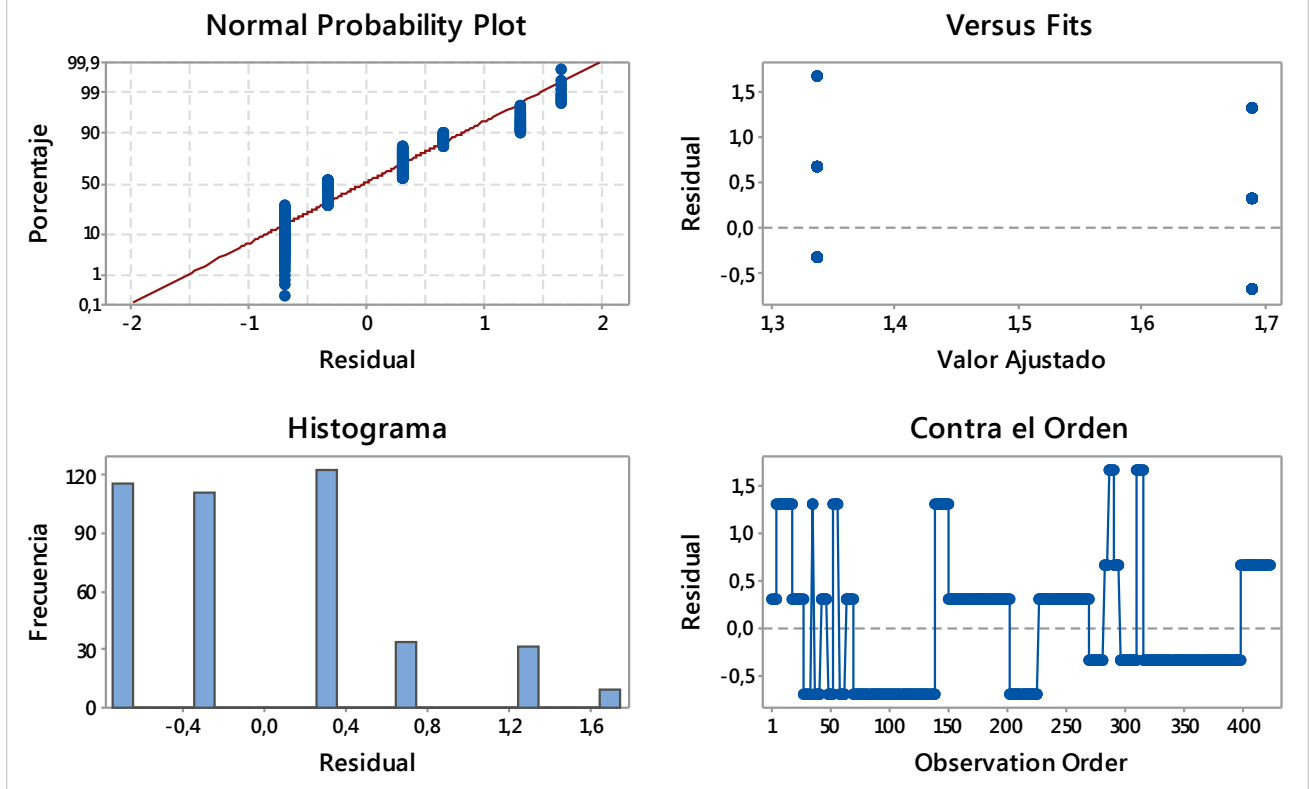
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,642575	6,59%	6,37%	5,73%

Means

BS	N	Mean	StDev	99% CI
0	154	1,3377	0,5855	(1,2037; 1,4716)
1	269	1,6914	0,6730	(1,5901; 1,7928)

Pooled StDev = 0,642575

Graficas de residuales para Color



Anexo 3. Resultados Análisis estadístico Leche UHT Deslactosada (Programa Minitab)

One-way ANOVA: pH DES versus BS DES

Method

Null hypothesis All means are equal
 Alternative hypothesis At least one mean is different
 Significance level $\alpha = 0,01$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
BS DES	2	0; 1

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
BS DES	1	0,1652	0,165235	38,03	0,000
Error	212	0,9210	0,004345		
Total	213	1,0863			

Model Summary

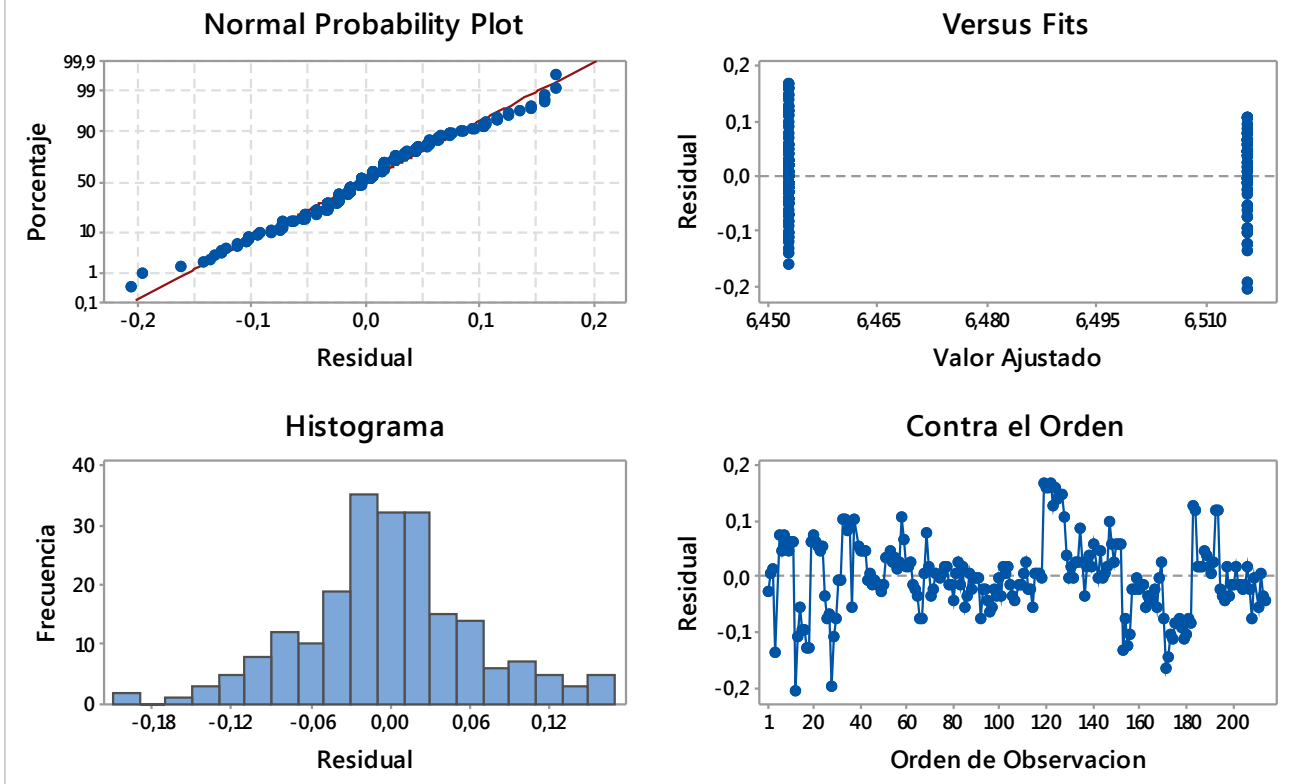
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,0659131	15,21%	14,81%	13,46%

Means

BS	N	Mean	StDev	99% CI
DES				
0	57	6,51579	0,07447	(6,49310; 6,53848)
1	157	6,45293	0,06256	(6,43926; 6,46660)

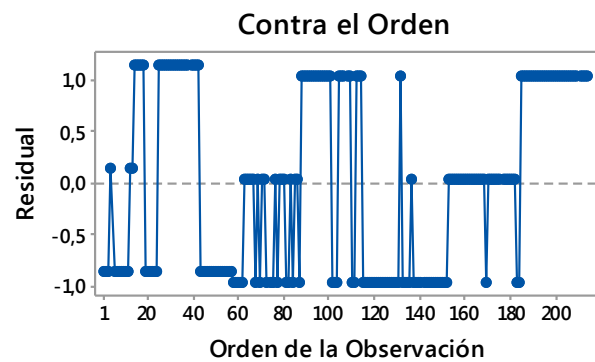
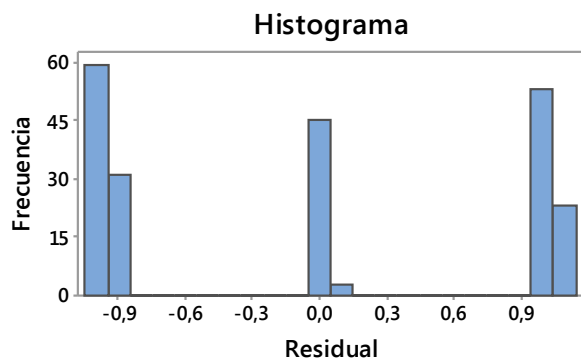
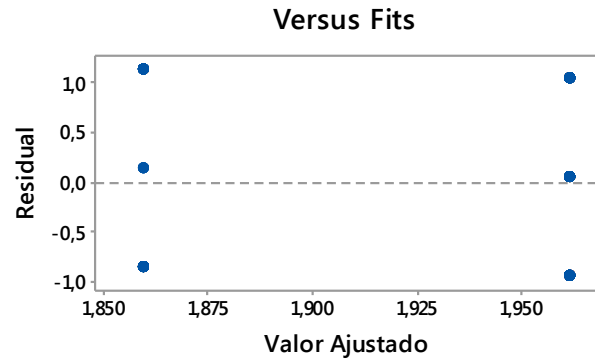
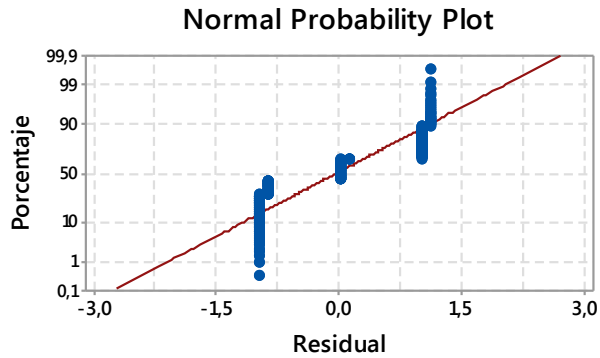
Pooled StDev = 0,0659131

Gráfico de Residuales para pH DES



One-way ANOVA: Sabor DES versus BS DES

Graficas de residuales para Sabor DES



Means

DES	N	Mean	StDev	95% CI
0	57	1,860	0,972	(1,630; 2,090)
1	157	1,9618	0,8465	(1,8231; 2,1004)

Pooled StDev = 0,881272

One-way ANOVA: Color DES versus BS DES

Method

Null hypothesis All means are equal
 Alternative hypothesis At least one mean is different
 Significance level $\alpha = 0,05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
BS DES	2	0; 1

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
BS DES	1	0,9959	0,9959	4,28	0,040
Error	212	49,3640	0,2328		
Total	213	50,3598			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,482544	1,98%	1,52%	0,00%

Means

BS	DES	N	Mean	StDev	95% CI
0	57	2,0877	0,5438	(1,9617; 2,2137)	
1	157	2,2420	0,4586	(2,1661; 2,3180)	

Pooled StDev = 0,482544

Graficas de residuales para Color DES

