

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

Evaluación de las prácticas actuales de formulación, procesamiento, manejo y del efecto de la acidificación sobre la reducción de patógenos y el aseguramiento de la inocuidad de leche agria artesanal producida en Costa Rica

Elaborada por:

Marcela Espinoza Mora

Carné: B12380

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2018

TRIBUNAL EXAMINADOR

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

Elaborado por:

Marcela Espinoza Mora

Aprobado por:

Phd. Marianela Cortés

Presidente del Tribunal

PhD. Jessie Usaga Barrientos

Directora del Proyecto

Lic. Diana Víquez Barrantes

Asesora del Proyecto

PhD. Eric Wong González

Asesor del Proyecto

MSc. Gabriela Davideovich

Profesora designada

DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL

La información generada en este proyecto es de uso público.

DEDICATORIA

Primeramente a Dios, por ser mi refugio y fortaleza en este proceso, a mi familia y amigos, por el apoyo incondicional y también a los productores de leche agria que participaron en el proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque he visto Su mano y Su guía en todo el proceso, porque ha sido mi fuente de inspiración y mi fuerza en momentos de dificultad e incertidumbre.

A mi familia y amigos, gracias por el ánimo y el apoyo en todo momento.

A mi mamá por acompañarme a comprar leche en las madrugadas y por llevarme y esperarme en la U en las noches.

A los productores artesanales de leche agria que me abrieron las puertas de sus casas y su negocio, por su ayuda y amabilidad.

A la profe Jessie por ser siempre una fuente de paz, ánimo y motivación, gracias por su paciencia y su ayuda incondicional, y gracias por hacer de este proceso algo que he podido disfrutar.

A la profe Diana por su disposición y su apertura, gracias por todas las giras y visitas, por siempre estar pendiente y dispuesta a ayudar con su conocimiento, experiencia y tiempo.

Al profe Eric por su disposición y apoyo, gracias por su tiempo, por compartir sus opiniones y sus conocimientos, y por siempre ser una fuente de claridad.

A ILSI Mesoamerica, por el apoyo económico y la confianza que tuvieron en mí para llevar a cabo el proyecto.

A Vanny Mora, Camacho y Alonso por toda su ayuda y disposición.

A Glori y a Lourdes por ayudarme y acompañarme en las noches y madrugadas mientras se hacía la leche agria. No sé qué hubiera hecho sin ustedes.

A la Escuela de Tecnología de Alimentos, los profesores y a todo el personal que fue parte de mi vida estos últimos años de formación universitaria, sin ustedes no estaría aquí hoy.

A mis compañeros por hacer de estos años una experiencia inolvidable.

Índice General

TRIBUNAL EXAMINADOR	i
DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
Índice General	v
Índice de cuadros	vii
Índice de figuras	viii
Acrónimos	ix
Resumen	x
1. Justificación	1
2. Objetivos	4
2.1. General	4
2.2. Específicos	4
3. Marco Teórico	5
3.1. Leche agria: proceso de elaboración y situación actual en Costa Rica.....	5
3.1.1. <i>Definición</i>	5
3.1.2. <i>Proceso de fermentación</i>	6
3.1.3. <i>Uso de cultivos lácticos iniciadores de fermentación</i>	10
3.1.4. <i>Inocuidad de productos lácteos fermentados: microbiología</i>	11
3.1.5. <i>Factores críticos de control</i>	16
3.1.6. <i>Situación actual de la producción de leche agria en Costa Rica</i>	18
3.2. Lineamientos de Buenas Prácticas de Manufactura.....	19
4. Materiales y métodos	20
4.1. Localización	20
4.2. Materias Primas.....	20
4.3. Actividades preliminares.....	21
4.3.1. <i>Búsqueda, contacto y elección de los productores artesanales de leche agria</i>	21
4.4. Metodología	22
4.4.1. <i>Caracterización del proceso de elaboración de leche agria</i>	22
4.4.2. <i>Evaluación de la elaboración de leche agria en planta piloto</i>	23
4.4.3. <i>Transferencia de la información a los productores</i>	26

5. Resultados y discusión	32
5.1. Descripción y caracterización del proceso de elaboración de leche agria artesanal producida en Costa Rica.....	32
5.1.1. <i>Diagnóstico de Buenas Prácticas de Manufactura</i>	32
5.1.2. <i>Perfil fisicoquímico y microbiológico de la leche agria analizada</i>	39
5.2. Determinación del tiempo en que la leche agria alcanza un pH = 4,4 y las curvas de acidificación y de crecimiento de BAL.....	42
5.3. Transferencia de los resultados obtenidos a los productores de leche agria	45
6. Conclusiones	49
7. Recomendaciones	50
8. Bibliografía	51
9. Anexos	58
9.1. Perfil microbiológico de distintas leches fermentadas de África.....	58
9.2. Herramienta para el diagnóstico de los productores de leche agria	58
9.3. Detalles de la ficha técnica del cultivo láctico utilizado para la elaboración de leche agria a nivel de planta piloto	66
9.4. Flujo de proceso de producción de leche agria de los distintos productores	67
9.5. Resultados preliminares de las curvas de acidificación	69
9.6. Material utilizado para el taller de capacitación.....	71
9.7. Imágenes tomadas durante la aplicación del taller de capacitación	87

Índice de cuadros

Cuadro I. Características de los microorganismos patógenos de mayor importancia en los productos lácteos fermentados.....	12-15
Cuadro II. Resumen de las condiciones de operación de los distintos tratamientos térmicos aplicados a la leche.....	17
Cuadro III. Información de los productores visitados durante la etapa de diagnóstico.....	21
Cuadro IV. Tratamientos y condiciones a utilizar para la determinación de la curva de acidificación (fermentación) correspondiente al segundo objetivo de este proyecto.....	24
Cuadro V. Información general del taller de capacitación.....	28
Cuadro VI. Resumen de los contenidos del taller de capacitación.....	30
Cuadro VII. Información de los productores visitados durante el diagnóstico y sus características en cuanto al manejo de la leche como materia prima.....	33-34
Cuadro VIII. Grado de cumplimiento de las BPM según las distintas secciones del reglamento de referencia.....	36
Cuadro IX. Condiciones de procesamiento de la leche agria.....	38
Cuadro X. Perfil microbiológico y los valores de pH de las muestras de leche agria de los productores artesanales visitados en el presente estudio.....	39
Cuadro XI. NMP de <i>E. coli</i> de las muestras de leche agria de los distintos productores visitados en el presente estudio.....	41
Cuadro XII. Tiempo estimado en horas en el que la leche agria, elaborada bajo distintas condiciones (pasteurización, uso de cultivo láctico y temperatura de incubación), alcanza un valor de pH = 4,4.....	42
Cuadro XIII. Resultados de la prueba de contrastes ortogonales para determinar el efecto del uso de cultivo láctico, la pasteurización de la leche y la temperatura de incubación sobre el tiempo estimado en horas en que la leche alcanza un pH = 4,4.....	42
Cuadro XIV. Resultados del análisis de las evaluaciones aplicadas a los participantes del taller de capacitación.....	46

Índice de figuras

Figura 1. Flujo de proceso básico para la elaboración de leche agria.....	6
Figura 2. Flujo de proceso para la elaboración de leche agria en planta piloto.....	23
Figura 3. Curva de acidificación del proceso de fermentación para la elaboración de leche agria bajo distintas condiciones.....	43
Figura 4. Curva de crecimiento de BAL del proceso de fermentación para la elaboración de leche agria bajo distintas condiciones.....	43
Figura 5. Resultados de la evaluación de satisfacción aplicada a los productores que participaron en el taller capacitación. (a. Sobre la actividad en general, b. Sobre el expositor, c. Metodología y recursos, d. Material didáctico impreso y e. Coordinación).....	47
Figura 6. Perfil microbiológico de distintas leches fermentadas de África (Narvhus & Gadaga, 2003).....	58
Figura 7. Flujo de proceso para la producción de LFN de la empresa A y B.....	67
Figura 8. Flujo de proceso para la producción de LFN de la empresa C.....	67
Figura 9. Flujo de proceso para la producción de LFN de la empresa E.....	68
Figura 10. Flujo de proceso para la producción de leche agria de la empresa D.....	68
Figura 11. Curva de acidificación de leche agria elaborada a partir de leche cruda e incubada a temperatura ambiente.....	69
Figura 12. Curva de acidificación de leche agria elaborada a partir de leche cruda e incubada a temperatura de refrigeración.....	69
Figura 13. Curva de acidificación de leche agria elaborada a partir de leche pasteurizada e incubada a 37 °C.....	70
Figura 14. Curva de acidificación de leche agria elaborada a partir de leche cruda e incubada a 37 °C.....	70

Acrónimos

ANDEVA: análisis de varianza

APE: agua peptonada estéril

ASOPROA: Asociación de Productores Agropecuarios de Santa Cruz

ATP: adenosín trifosfato

BAL: bacterias ácido lácticas/ recuento de bacterias ácido lácticas

BPM: Buenas Prácticas de Manufactura

CDC (por sus siglas en inglés): “Center for Disease Control and Prevention”

ETA: enfermedades transmitidas por alimentos

FAO (por sus siglas en inglés): “Food and Agriculture Organization”

FDA (por sus siglas en inglés): “Food and Drug Administration”

g: gramos

h: horas

INA: Instituto Nacional de Aprendizaje

L: litros

LFN: leche fermentada naturalmente

min: minutos

mL: mililitros

MyL: mohos y levaduras/ recuento de mohos y levaduras

NMP: número más probable/ número más probable de *E.coli*

OMS: Organización Mundial de la Salud

P CC A: pasteurizada, con adición de cultivo y a temperatura ambiente

P CC 37: pasteurizada, con adición de cultivo y a 37 °C

RT: recuento total aerobio mesófilo

RTCA: Reglamento Técnico Centroamericano

s: segundos

SENASA: Servicio Nacional de Salud Animal

SP SC A: sin pasteurización, sin adición de cultivo láctico y a temperatura ambiente

SP CC A: sin pasteurización, con adición de cultivo láctico y a temperatura ambiente

SP CC 37: sin pasteurización, con adición de cultivo láctico y a 37 °C

T: temperatura

UFC: unidades formadoras de colonias

Resumen

En el presente estudio se evaluaron las prácticas actuales de formulación, procesamiento, manejo y el efecto de la acidificación sobre la reducción de patógenos y el aseguramiento de la inocuidad de leche agria artesanal producida en Costa Rica. Se utilizó una herramienta de diagnóstico basada en la tabla de evaluación del Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.01.33:06 “Industria de Alimentos y Bebidas Procesados. Buenas Prácticas de Manufactura. Principios Generales.” y la adaptación de una herramienta utilizada en otros estudios. Se obtuvo como resultado principal las oportunidades de mejora en cuanto a la aplicación de las BPM, estas corresponden principalmente al cumplimiento de los requisitos para los alrededores, la ubicación, el diseño de las instalaciones físicas, el manejo y la disposición de los desechos y el control de plagas.

Se determinó el perfil microbiológico y los valores de pH promedio de la leche agria elaborada por los productores que participaron en el diagnóstico. Se obtuvo un rango de pH que varía de 4,0 a 4,7, valores del recuento total de aerobios mesófilos (RT) entre 7,5 y 9,5 log (UFC/g), del recuento de bacterias ácido lácticas (BAL) entre 7,4 y 9,4 log (UFC/g) y del recuento de mohos y levaduras (MyL) entre 3,0 y 6,3 log (UFC/g). Se encontró que un 83,3% de las muestras analizadas dieron positivo para la presencia de *E.coli* genérica y sobrepasan el límite máximo permitido (<3 NMP/g).

Se obtuvieron las curvas de acidificación y las de crecimiento de bacterias ácido lácticas para seis distintas condiciones de elaboración de leche agria a nivel de planta piloto, así como el tiempo estimado en horas en que se alcanza un valor de pH = 4,4 (t_f). Se obtuvo como resultado principal que el tratamiento en el que no se pasteuriza, no se hace uso de cultivo láctico, ni se controla la temperatura de incubación (SP SC A) es el que tarda el mayor tiempo ($t_f = 68 \pm 12$ h) para alcanzar el valor de pH deseado y presenta una mayor variabilidad. Los otros tratamientos presentan valores de t_f menores y con una menor variabilidad (SP CC A = 16 ± 3 h, SP CC 37 = 9 ± 1 h, P CC A = 14 ± 1 h y P CC 37 = 9 ± 1 h). Se concluye con un 95% de confianza, que el uso de cultivo láctico iniciador favorece el proceso de elaboración de leche agria para la obtención de un producto inocuo en menor tiempo.

Se aplicaron talleres de capacitación de acuerdo con las necesidades detectadas y tomando en cuenta los resultados obtenidos a partir de las curvas (de acidificación y de crecimiento de BAL)

para la elaboración de una guía de proceso para la producción de leche agria inocua. Se obtuvo un impacto positivo en los participantes en cuanto a la implementación de cambios en el proceso de elaboración de leche agria en sus empresas, asimismo, se observó una alta flexibilidad y apertura por parte de los participantes en la obtención de nuevo aprendizaje y se evaluó de manera positiva al facilitador del taller.

1. Justificación

Los peligros microbiológicos son un importante problema para la inocuidad de los productos lácteos, esto se debe a que la leche es un medio ideal para el crecimiento de microorganismos, y porque a lo largo de la cadena de producción, esta se ve expuesta al medio ambiente y a otros factores externos, como los mismos animales lecheros. Por estas razones, en la leche cruda pueden estar presentes microorganismos de deterioro, así como microorganismos patógenos. Según la FAO (2016a), la leche puede llegar a contener microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus* y *Brucella melitensis*.

Según el Reporte de Vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos, llevado a cabo en el 2014 en los Estados Unidos por el “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC, por sus siglas en inglés), el 31% de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) estuvieron asociados con el consumo de productos pesqueros, el 7% a carnes, el 5% a frutas y hortalizas, el 11% a pollo y los productos lácteos eran responsables de alrededor de un 9% de los brotes. Esto evidencia la importancia del aseguramiento de la inocuidad en productos lácteos. Asimismo, tomando en cuenta que no todos los brotes son identificados y/o reportados y en contraste con la realidad de dicho país, se puede tener una idea del panorama en el que puede encontrarse Costa Rica en este aspecto.

La pasteurización es el principal factor determinante de la inocuidad en el procesamiento de la leche para la elaboración de productos lácteos (FAO, 2016b). Sin embargo, no es el único factor que influye en la obtención de un producto lácteo inocuo, ya que se sabe que a pesar de la aplicación de tratamientos térmicos, los productores de leche a pequeña escala o “artesanal” encuentran dificultades para elaborar productos higiénicos, principalmente por razones como la comercialización, la manipulación, un proceso de elaboración informal y no reglamentado, la falta de incentivos financieros para mejorar la calidad de los productos e invertir en infraestructura adecuada y el nivel insuficiente de conocimiento y competencia en materia de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) por parte de los productores.

Otra forma de preservación de los productos lácteos, es la fermentación. Este proceso no es una novedad, sino que se cuenta con un historial de productos muy antiguo. El origen se da a partir

de la afirmación de que la leche cruda se deteriora a lo largo del tiempo debido a la acción microbiana. Sin embargo, a temperaturas moderadas, ciertos grupos de microorganismos pueden tener una actividad predominante y provocar una fermentación (Walstra *et al.*, 2005).

El grupo de las bacterias ácido-lácticas (BAL) es el que comúnmente altera las condiciones de la leche, de tal manera que se liberan diferentes metabolitos y se degradan sus principales componentes (es decir, carbohidratos, proteínas y lípidos) en estructuras más simples que pueden presentar mayor bioactividad, ser más fáciles de digerir y cumplir con los aspectos nutricionales que promueven la salud en el ser humano (Senan & Prajapati, 2015). Asimismo, la acidez es uno de los factores que afectan el crecimiento microbiano, por lo que su control puede inhibir el crecimiento de microorganismos de deterioro y patógenos (Canadian Dairy Commission, 2011; Virginia Cooperative Extension, 2011).

Por estas razones se atribuyen los distintos beneficios asociados con el consumo de productos lácteos fermentados. Asimismo, Narvhus & Gadaga (2003), realizaron una recopilación de información en la que se comprueba la variabilidad microbiológica de una leche fermentada naturalmente (LFN). Esta se produce a partir de la fermentación espontánea de la leche cruda, debido a la acción de microorganismos presentes de forma natural en la leche, durante un período de 1-3 días a temperatura ambiente (Gran *et al.*, 2002; Mutukumira, 1995). Los resultados de dicha revisión bibliográfica se pueden observar en el anexo 10.1. Perfil microbiológico de distintas leches fermentadas de África.

La realidad expuesta por Narvhus & Gadaga, (2003) con respecto al perfil microbiológico de una LFN, da pie a una serie de investigaciones en cuanto a la identificación de bacterias de deterioro, y más importante, acerca de la presencia de microorganismos que afectan directamente la inocuidad del producto y en consecuencia la salud de los consumidores. En estudios realizados principalmente en Zimbabue, África, se ha comprobado la presencia de distintas bacterias patógenas en LFN producida en lecherías de pequeña escala o artesanales. Según Gran *et al.*, (2003), se logró identificar *Staphylococcus aureus* y *E.coli* enterotoxigénica en distintas muestras de LFN y leche pasteurizada y con adición de cultivo.

En otras investigaciones, se logró determinar la sobrevivencia o longevidad de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* en leche agria. Se mostró que en la fermentación de una leche que fue inoculada con estas bacterias y que se expone a las distintas temperaturas del ambiente, se puede detectar un número de colonias que va en disminución a partir del quinto día después de la

inoculación (Mattick & Hirsch, 1946; Dormer, 1953). Asimismo, *M. bovis* puede sobrevivir en la leche cruda, LFN y en leche pasteurizada con cultivo durante períodos de tiempo que representan un riesgo de exposición a las personas que consumen estos productos. También se determinó que la temperatura a la que se lleva a cabo el proceso de fermentación y el almacenamiento de la leche afecta sustancialmente el tiempo de supervivencia de *M. bovis* (Michel *et al.*, 2015). De ambos estudios se concluye que el consumo frecuente de productos como LFN, derivados de vacas infectadas, puede ser suficiente para exponer a los seres humanos la dosis infecciosa necesaria para ocasionar una infección gastrointestinal.

Estos hallazgos demuestran la importancia de realizar esfuerzos para mejorar y garantizar la inocuidad de este producto. En Costa Rica, no se cuenta con ningún tipo de información al respecto, se sabe que es un producto que se produce artesanal e industrialmente y que se consume, pero usualmente no se incluye en ningún tipo de documento disponible sobre el consumo y/o realización de productos lácteos o su aporte socio-económico a nivel nacional. Por lo que a su vez, esta realidad afecta la promoción y subsistencia de un producto autóctono y tradicional como lo es la leche agria.

La leche agria que se consume en Costa Rica es muy popular para la realización de bebidas u otros alimentos en la cocina tradicional costarricense, así como para consumo directo, según comentan algunos vendedores. Asimismo, sólo en la zona de Turrialba, Cartago, existen alrededor de 180 productores de leche agria, de los cuales se presume que su elaboración es de producción y consumo “propio” en muchos casos, o que se produce semanalmente conforme a pedidos locales. También se sabe que ciertos productores posicionan sus productos en “Ferias del Agricultor”.

Esto último evidencia la importancia y relevancia del estudio en cuestión, principalmente en cuanto a la documentación y aprovechamiento de la información y la transferencia del conocimiento que se logre alcanzar y de las oportunidades de mejora observadas a lo largo de su realización.

Por estas razones, bajo el marco de una iniciativa propiciada por ILSI Mesoamérica, en el proyecto denominado: “Validación de las medidas de control para reducir patógenos y garantizar la inocuidad de tres productos lácteos artesanales producidos en la región Mesoamericana” (adscrito a 745-A6-906 – Programa Mejoramiento de la Industria Láctea), que busca generar la información y evidencia necesaria para garantizar la inocuidad de diversos productos lácteos producidos de manera artesanal, es que se llevó a cabo esta investigación.

Con el fin de llegar a conocer y determinar cómo se elabora la leche agria artesanal en Costa Rica, la realidad, las condiciones y la variabilidad de su producción en distintas zonas del país, es que se planteó el presente estudio. En él se evaluó el desarrollo del proceso de fermentación, mediante la reproducción de procesos de producción que permitieron determinar si existe un proceso que minimice el desarrollo de patógenos en la leche agria producida de manera artesanal. Esto se realizó con el objetivo de que la elaboración del producto sea factible y que permitiera la transferencia de la información, obtenida y documentada durante el avance de la investigación, a los productores artesanales que participaron de este estudio.

2. Objetivos

2.1. General

- Evaluar las prácticas actuales de formulación, procesamiento y manejo de la leche agria artesanal producida en Costa Rica para identificar y transferir a productores artesanales los controles necesarios que permitan garantizar su inocuidad.

2.2. Específicos

- Caracterizar la formulación, el proceso de elaboración y el manejo de leche agria en al menos 3 empresas artesanales costarricenses mediante un diagnóstico que contemple el grado de cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), formulación, flujo de proceso y determinación del perfil microbiológico y fisicoquímico del producto.
- Evaluar el efecto de la acidificación sobre la reducción de patógenos y el aseguramiento de la inocuidad de leche agria artesanal mediante su producción a nivel de planta piloto, identificación de los factores críticos de control y determinación de la curva de acidificación y de crecimiento bacterias lácticas.
- Transferir a los productores artesanales mediante una capacitación, las oportunidades de mejora, las condiciones de formulación, procesamiento y manejo que permiten la producción inocua de leche agria.

3. Marco Teórico

3.1. Leche agria: proceso de elaboración y situación actual en Costa Rica

3.1.1. *Definición*

Según Walstra *et al.*, (2005), la leche agria se puede clasificar como un producto lácteo fermentado. Esta se produce a partir de la fermentación espontánea de leche cruda debido a la acción de microorganismos presentes de forma natural en la leche, durante un período de 1-3 días a temperatura ambiente (Gran *et al.*, 2002; Mutukumira, 1995), así como también puede elaborarse a partir de la adición de cultivos bacterianos en la leche cruda o tratada térmicamente (Kumar *et al.*, 2015).

La fermentación se produce debido a la presencia y acción predominante de BAL y según Walstra *et al.*, (2005), la presencia de BAL promueve la obtención de un producto con un pH bajo (de 4,6 a 4,0), un bajo potencial redox, la presencia de ácidos no disociados (por ejemplo, ácido láctico) y también otros metabolitos, tales como H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) y algunos compuestos con actividad antibiótica. Estas características influyen en la atribución de los distintos beneficios al consumo de productos lácteos fermentados, incluida la leche agria.

Según Mayo *et al.*, (2010), las distintas formas del proceso de elaboración de leche agria se resumen en la figura 1:

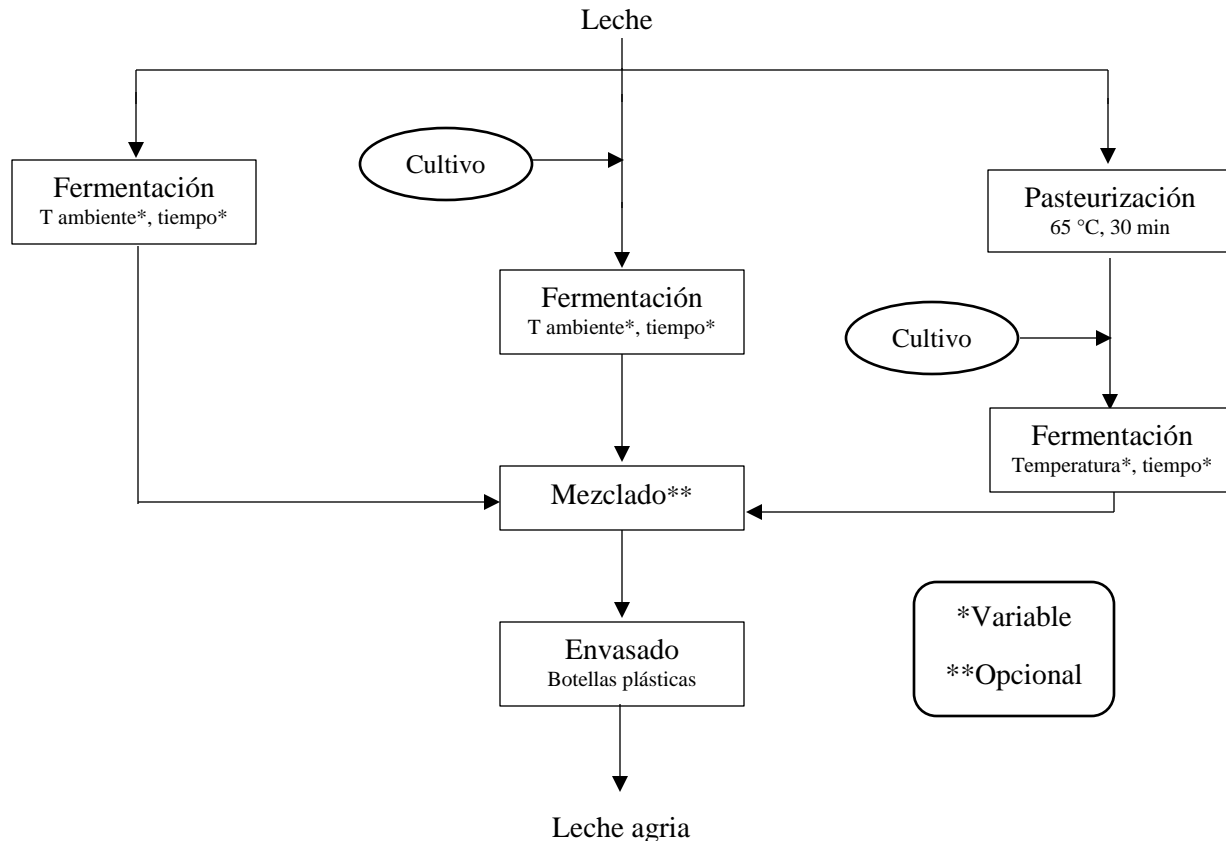


Figura 1. Flujo de proceso básico para la elaboración de leche agria.

Asimismo, las leches fermentadas (sin importar el tipo), en su mayoría se caracterizan debido a sus propiedades físicas únicas: su alta viscosidad, “formación de hilos” (si se aplica una cuchara a la superficie de la leche, aparecen cadenas largas cuando se levanta la cuchara) y su sabor y aroma ácido (Walstra *et al.*, 2005).

3.1.2. *Proceso de fermentación*

El proceso de fermentación en leche, antes mencionado, se utiliza como un método de preservación. Este inició, posiblemente, de manera espontánea hace al menos 10000 años atrás (Litopoulou-Tzanetaki & Tzanetakis, 2014). La fermentación conduce a la acidificación y la coagulación de la leche, así como un aumento de la inocuidad del producto debido al descenso del pH, como se mencionó anteriormente, y también a causa de la inhibición de microorganismos de deterioro y patógenos, por competencia (Mayo *et al.*, 2010).

Asimismo, se conoce que el proceso de fermentación se desarrolla sin producir una alteración de los nutrientes presentes en la leche, lo cual facilita el consumo y permite obtención de los distintos beneficios de la leche, por un período de tiempo más prolongado (Béal & Helinck, 2015).

La fermentación en general es un proceso complejo que es influenciado por distintos factores. Este proceso en productos lácteos puede deberse a: (1) una fermentación láctica debido la acción de BAL mesófilas, (2) una fermentación láctica con acción de BAL termófilas, así como también a (3) una fermentación alcohólica-láctica, que involucra BAL y levaduras, y por último, a (4) una fermentación tipo (1) o (2) junto con el crecimiento y desarrollo de mohos (Walstra *et al.*, 2005).

Según Béal & Helinck, (2015), este tipo de fermentación ácido-láctica, se relaciona directamente con el metabolismo de la lactosa, el azúcar presente en la leche. Este proceso metabólico se conoce como glicólisis, y es mediante el cual, las BAL obtienen ácido láctico y energía en forma de ATP (adenosín trifosfato) para su crecimiento.

Actualmente se conocen dos vías en las que se lleva a cabo el proceso de fermentación; (i) la vía metabólica homofermentativa y (ii) la vía heterofermentativa. Las bacterias que utilizan (i) son principalmente *Lactococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Pediococcus* sp. y lactobacilos del grupo I, tales como: *L. delbrueckii*, *L. acidophilus* y *L. helveticus*. Asimismo, *Leuconostoc* sp., *Oenococcus* sp., *Weissella* sp. y los lactobacilos del grupo II y III como por ejemplo: *L. rhamnosus*, *L. casei* y *L. brevis*, realizan (ii). La principal diferencia entre ambas vías no se debe solamente a las bacterias que la realizan como parte de su metabolismo, sino a los productos obtenidos al final de la glicólisis, a los que se le atribuye la acidificación de la leche y de los cuales depende la naturaleza del producto final. El producto en (i) es ácido láctico y en (ii) ácido láctico y etanol o ácido acético.

Durante la fermentación también sucede la proteólisis de la caseína. Esta resulta en la formación de la textura, el aroma y el sabor característicos del producto terminado (Béal & Helinck, 2015). Se han encontrado más de cien compuestos volátiles después del desarrollo de un proceso de fermentación, incluyendo compuestos de carbonilo, alcoholes, ácidos, ésteres, hidrocarburos, compuestos aromáticos, compuestos que contienen azufre y compuestos heterocíclicos. En leches fermentadas se han encontrado en bajas concentraciones (Cheng, 2010). Entre ellos se encuentran el ácido láctico, antes mencionado, el acetaldehído, el diacetilo y la acetoína (Routray & Mishra, 2011). Su nivel final en los productos fermentados depende de las

cepas bacterianas, la composición de la leche y las condiciones de procesamiento (Béal & Helinck, 2015).

Asimismo, según Mayo *et al.*, (2010), el desarrollo de las BAL a altas densidades celulares durante la fermentación, modifica tanto proteínas como grasas presentes en la leche, esto mediante sus sistemas proteolíticos y lipolíticos complejos (Smit *et al.*, 2005). Ambos procesos contribuyen con el desarrollo de las características reológicas y sensoriales finales de los productos fermentados.

Según Béal & Helinck, (2015), la calidad de la leche (que resulta de su composición y el tratamiento térmico), las condiciones de fermentación (como la temperatura y el tiempo), las cepas de BAL utilizadas y la presencia de aditivos o bacteriófagos en la leche son los factores que afectan el crecimiento de los cultivos iniciales y la tasa de desarrollo ácido láctico. Asimismo, según Walstra *et al.*, (2005) también influyen factores tales como: la especie animal de la cual se origina la leche y de forma más específica, el porcentaje de grasa de la leche y su concentración.

A continuación se describen las formas en que afectan los factores, antes mencionados, el desarrollo del proceso de fermentación y crecimiento de las BAL en la leche:

3.1.2.1. Calidad de la leche

Si se lleva a cabo un tratamiento térmico, ya sea pasteurización o esterilización, al someter la leche a dicho tratamiento térmico ocurren algunos fenómenos que afectan la composición de la leche, por ejemplo: algunos compuestos antibacterianos tales como aglutininas y lactoperoxidasas, presentes en la leche cruda, se inactivan por dichas condiciones de calentamiento. Estos fenómenos promueven el crecimiento de las BAL durante la etapa de fermentación. Además, el calentamiento de la leche da como resultado la liberación de compuestos tales como péptidos, aminoácidos libres y ácido fórmico, que estimulan el crecimiento de *S. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Courtin & Rul, 2004).

Asimismo, se ha demostrado que el contenido de ácidos grasos de la leche afecta la cinética de fermentación, que es más rápida cuando hay un mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados en la leche (Florence *et al.*, 2012).

3.1.2.2. Condiciones de fermentación

La temperatura y el tiempo de fermentación son parámetros importantes que tienen un efecto en las propiedades tecnológicas y sensoriales de las leches fermentadas. De hecho, la tasa de fermentación está relacionada con la actividad metabólica de las BAL y las bifidobacterias, que a su vez depende de la temperatura de fermentación (Béal & Helinck, 2015).

Las cantidades de ácido láctico, acetaldehído y acetoina producidas varían entre las bacterias y de acuerdo con la temperatura y el tiempo de fermentación y están relacionadas con el pH final (Ostlie *et al.*, 2005). Asimismo, la temperatura de incubación y el tiempo de fermentación influyen de manera importante en la obtención de las propiedades reológicas deseadas en el producto final.

3.1.2.3. Cepas de bacterias, aditivos y bacteriófagos

Las cepas y las combinaciones de cepas utilizadas también afectan el proceso fermentación, por ejemplo, existen cepas acidificantes que conducen a tiempos de fermentación más cortos que otras (Béal *et al.*, 1999; Florence *et al.*, 2009). Asimismo, la presencia de ciertos aditivos como endulzantes, colorantes y saborizantes, pueden tener un impacto en la tasa de crecimiento de las BAL y por lo tanto en el desarrollo de la fermentación (Béal & Helinck, 2015).

Según Béal & Helinck, (2015), los bacteriófagos que afectan a los cultivos lácteos son un problema muy importante en la industria de leches fermentadas, puesto que provoca una alta variabilidad del producto y esto puede provocar una reducción de la productividad que resultaría en importantes pérdidas económicas. Los bacteriófagos pueden provenir de diversas fuentes, como leche cruda, cultivos iniciales, el aire o las superficies en la planta (Garneau & Moineau, 2011).

Los fagos de las BAL, las interacciones fago-huésped y la respuesta del huésped a la infección se han estudiado ampliamente (Mahony *et al.*, 2012). Su presencia induce a la baja producción de ácido láctico, reducción de la coagulación de la leche y una lisis del cultivo. Esto afecta de manera negativa la calidad del producto final y a su vez disminuye la productividad y efectividad del cultivo.

3.1.3. *Uso de cultivos lácticos iniciadores de fermentación*

Dado que los procesos de fermentación tradicional suceden como resultado de las actividades de la microbiota natural presente o agregada al alimento, a través de los años, se ha tratado de aislar y estudiar las características de dichos microorganismos (Koutinas, 2017).

Las BAL y las levaduras son reconocidas como los cultivos iniciadores utilizados con mayor frecuencia en fermentaciones en alimentos (Batt, 2016). Estos ya se encuentran disponibles por proveedores comerciales, las BAL se aceptan naturalmente como GRAS (generalmente consideradas como seguras) para consumo humano.

La mayoría de los cultivos de BAL que se usan hoy en día provienen originalmente de la microbiota “contaminante” de la leche. Estas bacterias probablemente provienen de la vegetación y flora que se encuentra alrededor durante el proceso de ordeño y durante el manejo de la leche, como en el caso de *Lactococcus* sp. y *Leuconostoc* sp. Otros (por ejemplo, *Enterococcus* sp.) y algunos lactobacilos (por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus*) probablemente provienen de los intestinos de animales y humanos (Koutinas, 2017).

El grupo de las BAL son microorganismos aerotolerantes no esporulados y anaerobios que presentan capacidades biosintéticas limitadas, por lo que requieren un medio rico para crecer y una serie de factores de crecimiento, como azúcares y proteínas, aminoácidos libres, vitaminas, y nucleótidos, sin embargo la mayoría de las BAL son autótrofas para una gran cantidad de aminoácidos y vitaminas (Teusink & Molenaar, 2017).

El uso de cultivos lácticos trae consigo distintos beneficios, entre ellos: la reducción del tiempo de fermentación, disminuye la probabilidad de que ocurran errores durante la fermentación y conduce a la estandarización del producto final (Tamang *et al.*, 2016). La calidad de los alimentos fermentados depende de la población y la diversidad microbiana en la materia prima. A diferencia de una fermentación que se lleva a cabo de forma natural, el uso de cultivos permite un mayor control sobre el proceso de fermentación y la calidad e inocuidad del producto final.

3.1.4. Inocuidad de productos lácteos fermentados: microbiología

La inocuidad de los alimentos ha sido una preocupación constante desde antes del descubrimiento de los microorganismos. Este término se relaciona directamente con la presencia de microorganismos patógenos en los alimentos y su capacidad de causar enfermedades en los seres humanos y se sabe que existen reportes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) desde el comienzo del consumo de alimentos (Batt, 2016).

En la actualidad, las enfermedades transmitidas por los alimentos son subestimadas, especialmente porque los casos individuales se extienden por amplias regiones geográficas y, a menudo, no se reconocen porque no están vinculados entre sí. Asimismo, en países en vías de desarrollo, la detección de ETA por parte de las autoridades es muy baja (OMS, 2017; Batt, 2016).

Los esfuerzos para mejorar la inocuidad de los alimentos son interminables y dinámicos. Los alimentos no inocuos, que contienen bacterias patógenas, virus, parásitos o sustancias químicas, causan más de 200 enfermedades, que van desde diarrea hasta cánceres (OMS, 2017; Batt, 2016). Es por esto que es de gran importancia el control de la inocuidad como mecanismo de prevención de distintas enfermedades y es uno de los problemas más importantes que enfrentamos como sociedad (Batt, 2016).

En el caso de productos lácteos fermentados se puede identificar distintos microorganismos que afectan directamente su inocuidad. En el Cuadro I se presenta un resumen de las características de las bacterias patógenas asociadas con este tipo de productos.

Cuadro I. Características de los microorganismos patógenos de mayor importancia en los productos lácteos fermentados.

Bacteria	Condiciones de crecimiento		Fuentes de contaminación	Patogenicidad
	Temperatura	pH		
<i>Escherichia coli</i> O157: H7	Óptima: 37 °C Sobrevive y se reproduce en un rango de 7-50 °C (OMS, 2018a).	Se reproduce en pH ≤ 4,4 (OMS, 2018a). Puede sobrevivir en pH de hasta 2,5 (Haarmann <i>et al.</i> , 2018).	Origen: intestino distal de los organismos de sangre caliente. El reservorio principal de este patógeno es el ganado bovino. Se ha encontrado en productos cárnicos crudos o poco cocinados, en leche cruda y en hortalizas contaminadas por materia fecal (OMS, 2018a).	Es el serotipo de <i>E. coli</i> productora de toxina Shiga más importante por su impacto en la salud pública. Entre los síntomas de la enfermedad destacan los calambres abdominales y la diarrea, que puede progresar en algunos casos a diarrea sanguinolenta. También puede haber fiebre y vómitos. La mayoría de los pacientes se recuperan en el término de diez días, pero en un pequeño porcentaje de los casos (especialmente niños pequeños y ancianos) la infección puede conducir a una enfermedad potencialmente mortal, como el síndrome hemolítico urémico (insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y trombocitopenia). Presenta una tasa de letalidad de 3-5% (OMS, 2018a).
<i>Staphylococcus aureus</i>	Óptima: 37 °C Sobrevive y se reproduce en un rango de 7-48 °C La producción de enterotoxina se da de manera óptima a 40-45 °C (Adams, 2009).	Se reproduce en valores de pH entre 6,0-7,0. Sin embargo también ocurre en un rango de pH de 4,0-10,0. La producción de toxina se da de manera óptima a un pH de 7,0-8,0 (Adams, 2009)	Alrededor de un 30% de la población mundial es portadora de <i>S. aureus</i> en su piel, especialmente dentro de su nariz (CDC, 2011). Algunos alimentos como productos cárnicos, queso, pollo crudo, helados y algunos vegetales se han visto contaminados con <i>S.aureus</i> , por un mal manejo y una preparación inadecuada (Adams, 2009).	Provoca intoxicación alimentaria puesto que la bacteria crece lo suficiente en un material alimenticio para producir una enterotoxina, que es la que causa enfermedad. El período de incubación es corto, típicamente 2-4 h, y las náuseas, los vómitos, los calambres estomacales y las arcadas predominan, aunque también se produce diarrea (Adams, 2009).

Cuadro I. Continuación.

Bacteria	Condiciones de crecimiento		Fuentes de contaminación	Patogenicidad
	Temperatura	pH		
<i>Salmonella</i> spp.	Sobrevive y se reproduce en un rango de 7-46 °C (algunas pueden hacerlo hasta en 5 °C) (Bell & Kyriakides, 2009).	Sobrevive y se reproduce en un rango de pH = 4,5-9,5 (algunas pueden hacerlo hasta en en pH = 3,8) (Bell & Kyriakides, 2009).	Se encuentra comúnmente en el tracto gastrointestinal de animales vertebrados como algunos reptiles (serpientes, tortugas y lagartos), anfibios (sapos) y los polluelos de algunas aves y en ganado. En alimentos se ha encontrado <i>Salmonella</i> spp. en huevos, productos de res y aves de corral, en jugos y leche sin pasteurizar y en frutas y vegetales crudos (FDA, 2012)	El género <i>Salmonella</i> está dividido en dos especies que pueden causar enfermedades en humanos: - <i>S. entérica</i> - <i>S. bongori</i> Puede causar dos tipos de enfermedades, dependiendo del serotipo: 1) Salmonelosis no tifoidea: náusea, vómito, dolor abdominal, diarrea, fiebre y dolores de cabeza, 2) Fiebre tifoidea: fiebre alta, letargo, dolor abdominal, diarrea, dolor de cabeza y pérdida del apetito. La fiebre tifoidea es más grave y tiene una mayor tasa de mortalidad que la salmonelosis no tifoidea (FDA, 2012).
<i>Listeria monocytogenes</i>	Sobrevive y se reproduce a temperaturas de -1,5-45 °C (Bell & Kyriakides, 2009).	Sobrevive y se reproduce a pH = 4,4-9,4 (Bell & Kyriakides, 2009).	La bacteria es ubicua en el medio ambiente y se puede encontrar en ambientes húmedos, suelo y vegetación en descomposición. Muchos alimentos se han asociado con <i>L. monocytogenes</i> , por ejemplo: leche cruda, leche pasteurizada inadecuadamente, leche con chocolate, quesos, helado, verduras crudas, carne de ave y productos crudos, salchichas y carnes frías, y pescado crudo, ahumado y otros mariscos (FDA, 2012).	La infección por <i>L. monocytogenes</i> causa dos formas de enfermedad en humanos: 1) enfermedad gastrointestinal no invasiva (pasajera) 2) la forma más grave e invasiva de la enfermedad, que puede causar septicemia y meningitis. Las manifestaciones dependen del huésped, en personas inmunocomprometidas se manifiesta la forma más grave, incluso las mujeres embarazadas que están infectadas pueden sufrir un aborto espontáneo o que su hijo nazca muerto, y los nacidos vivos pueden tener bacteremia y meningitis. Un tercio de los casos confirmados de infecciones materno-fetales llevan a aborto o muerte fetal. De lo contrario, las personas sanas pueden tener síntomas leves como fiebre, dolores musculares, náuseas y vómitos y, a veces, diarrea. Cuando la forma más grave de la infección se desarrolla y se disemina al sistema nervioso, los síntomas pueden incluir dolor de cabeza, rigidez en el cuello, confusión, pérdida de equilibrio y convulsiones (FDA, 2012).

Cuadro I. Continuación.

Bacteria	Condiciones de crecimiento		Fuentes de contaminación	Patogenicidad
	Temperatura	pH		
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Óptima: 30 °C Puede sobrevivir a temperaturas de congelación y reproducirse a < 4 °C (FDA, 2012).	pH óptimo = 7,60 Puede sobrevivir y crecer en un rango de pH = 4,00-10,00 (FDA, 2012).	La principal fuente de contaminación es en productos crudos o mal cocidos, especialmente cerdo, leche y agua mal tratada (CDC, 2016).	Los síntomas de la yersiniosis dependen de la edad de la persona infectada. La infección ocurre con mayor frecuencia en niños pequeños. Los síntomas comunes en los niños son fiebre, dolor abdominal y diarrea, que a menudo es sanguinolenta. Los síntomas se desarrollan de 4 a 7 días después de la exposición y pueden durar de 1 a 3 semanas o más. En niños mayores y adultos, el dolor abdominal y la fiebre pueden ser los síntomas predominantes. Las complicaciones son raras y pueden incluir erupción cutánea, dolores en las articulaciones o propagación de bacterias al torrente sanguíneo (CDC, 2016).
<i>Clostridium botulinum</i>	Óptima: 35-40 °C Puede sobrevivir y reproducirse a ≥ 10 °C (Gibbs, 2009).	Sobrevive y se reproduce a pH ≥ 4,60 (Gibbs, 2009).	Se encuentra en el ambiente, principalmente en la tierra. Los posibles alimentos que son fuentes de <i>C. botulinum</i> son: carnes, vegetales, alimentos enlatados y la miel (esta última principalmente en niños) (Gibbs, 2009).	Es un bacilo formador de esporas que produce una neurotoxina muy potente. Las esporas son resistentes al calor y pueden sobrevivir en alimentos que están incorrectamente o mínimamente procesados. Se reconocen siete tipos de botulismo (A, B, C, D, E, F y G), en función de la especificidad antigénica de la toxina producida por cada cepa. Los tipos A, B, E y F causan botulismo humano. La mayoría de las cepas producen solo un tipo de toxina, pero se han informado cepas que producen tipos de toxinas duales (FDA, 2012). Las toxinas botulínicas son neurotóxicas, lo cual significa que afectan al sistema nervioso y la enfermedad se caracteriza por una parálisis flácida descendente que puede producir insuficiencia respiratoria. Los síntomas iniciales incluyen fatiga, debilidad y vértigo, seguidos generalmente por visión borrosa, sequedad de boca y dificultad para tragar y hablar. También pueden concurrir vómitos, diarrea, constipación e inflamación abdominal. La incidencia del botulismo es baja, pero la tasa de mortalidad es alta si no se realiza un diagnóstico precoz y se dispensa a tiempo el tratamiento adecuado (OMS, 2018b).

Cuadro I. Continuación.

Bacteria	Condiciones de crecimiento		Fuentes de contaminación	Patogenicidad
	Temperatura	pH		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> var. <i>bovis</i>	La temperatura óptima para su crecimiento varía entre 25 °C a más de 50 °C. Puede sobrevivir a menos de 24 °C y hasta 12 °C (FDA, 2012).	Resistente a ácidos y soluciones alcalinas (FDA, 2012).	Se encuentran en el ambiente, principalmente en el agua, el suelo, en vacas con mastitis y en el tracto gastrointestinal de los animales (FDA, 2012).	<i>M. bovis</i> causa tuberculosis en el ganado y se considera una enfermedad zoonótica que también afecta a los humanos. La ingestión de alimentos contaminados puede provocar la infección del tracto gastrointestinal u otras partes del cuerpo, por ejemplo, los pulmones o los ganglios linfáticos. La enfermedad puede causar la muerte si no se trata. Los síntomas típicos incluyen fiebre, sudores nocturnos, fatiga, pérdida de apetito y pérdida de peso. Otros síntomas dependen de la parte del cuerpo afectada; por ejemplo, tos crónica, esputo manchado de sangre o dolor en el pecho, si los pulmones están afectados, o diarrea, dolor abdominal e hinchazón, si el tracto gastrointestinal se ve afectado. Las infecciones en humanos también pueden ser asintomáticas (FDA, 2012).
<i>Campylobacter jejuni</i>	La temperatura óptima para su crecimiento es entre 37-42 °C (Axelsson <i>et al.</i> , 2017).	Puede crecer en valores de 4,0 a 12,0 (Axelsson <i>et al.</i> , 2017).	Las especies de <i>Campylobacter</i> sp. están ampliamente distribuidas en la mayoría de los animales de sangre caliente. Son frecuentes en animales como aves de corral, ganado vacuno, cerdos, y en mascotas, incluyendo gatos y perros. La principal ruta de transmisión es a través de carne y productos cárnicos poco cocidos, así como de leche cruda o contaminada y agua contaminada o el hielo (OMS, 2018c).	El inicio de los síntomas de la campilobacteriosis generalmente ocurre de 2 a 5 días después de la infección con la bacteria, pero puede variar de 1 a 10 días. Los síntomas más comunes de las infecciones incluyen diarrea con sangre, dolor abdominal, fiebre, dolor de cabeza, náuseas y vómito, estos suelen durar de 3 a 6 días. La muerte por campilobacteriosis es rara y generalmente se limita a niños muy pequeños o pacientes ancianos, o a aquellos que ya padecen otra enfermedad grave como el SIDA. Complicaciones como bacteremia, hepatitis, pancreatitis y aborto espontáneo se han notificado con diversos grados de frecuencia. Las complicaciones post-infección pueden incluir artritis reactiva y trastornos neurológicos como el síndrome de Guillain-Barré, una forma de parálisis parecida a la polio que puede provocar disfunción neurológica respiratoria y grave en un pequeño número de casos (OMS, 2018c)

Fuente: elaboración propia

3.1.5. Factores críticos de control

El *Codex Alimentarius* define un punto o factor crítico de control como "un paso en el que se puede aplicar el control y es esencial para prevenir o eliminar un peligro para la inocuidad de los alimentos o reducirlo a un nivel aceptable".

Según Senan & Prajapati (2015), durante la producción de una leche fermentada, a partir de una cepa o mezcla de cepas mesófilas del grupo de BAL, se puede determinar tres factores críticos de control. La pasteurización, en la que se controlan dos factores: la temperatura y el tiempo de exposición a una determinada temperatura, la incubación en la que se debe controlar el pH final del producto y la temperatura durante el almacenamiento, esto último por tratarse de un producto refrigerado.

3.1.5.1. Pasteurización: tiempo y temperatura de proceso

El tratamiento térmico de los alimentos se lleva a cabo para lograr la destrucción de las bacterias patógenas presentes, así como también, se logra la destrucción de bacterias de deterioro y algunas enzimas que provocan degradación en los alimentos (Fellows, 2017; Ramesh 2003). Este proceso se realiza mediante el calentamiento, ya sea directo o indirecto, del alimento y que busca extender la vida útil de los productos y mejorar su calidad manteniendo, lo mejor posible, las propiedades del alimento (Ramesh, 2003). Por lo tanto, el tratamiento térmico, es un paso dentro de un proceso de producción que pretende asegurar la calidad e inocuidad del producto.

La severidad del tratamiento térmico que se aplica a un alimento se determina principalmente con respecto al pH del producto. En alimentos de baja acidez, como la leche ($\text{pH} > 4,5$), el enfoque del tratamiento térmico es la destrucción de bacterias patógenas, mientras que en alimentos cuyo $\text{pH} < 4,5$ la destrucción de microorganismos de deterioro y enzimas usualmente es más relevante. En el caso de la leche, el principal objetivo de la pasteurización es la destrucción de las bacterias *Brucella abortus*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Coxiella burnetti* y de manera conjunta se logra la destrucción de otras bacterias e inactivación de enzimas (Ramesh, 2003).

Los tratamientos térmicos, como la pasteurización, se llevan a cabo bajo condiciones específicas según el objetivo, la naturaleza del alimento y los microorganismos que se desea eliminar. Estas condiciones se definen en un tiempo y temperatura, las cuales se conocen como variables críticas y debido a que la pasteurización pretende garantizar la inocuidad del producto,

es de suma importancia el control sobre las variables críticas durante la producción (Ramesh, 2003).

Para el caso de la leche, según la FDA (2015), la pasteurización se puede llevar a cabo de distintas formas. A continuación, en el Cuadro II se resumen las condiciones.

Cuadro II. Resumen de las condiciones de operación de los distintos tratamientos térmicos aplicados a la leche.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (min*, s)	Equipo	Otras consideraciones
Pasteurización por lote	63	30*	Marmita u olla Termómetro	El tratamiento se realiza con agitación constante.
Alta temperatura corto tiempo (HTST)	72	15	Sistema de pasteurización de flujo constante	Control de flujo automático. Dispositivo de desviación de flujo. Tubo de retención. Bomba o dispositivos de promoción de flujo.
	89	1,0		
	90	0,5		
	94	0,1		
	96	0,05		
Ultra alta temperatura (UHT)	≥ 138	≥ 2		

Fuente: Tomado de FDA (2015).

Según las condiciones observadas en el Cuadro II, se recomienda la pasteurización por lote para la elaboración de productos lácteos en el sector artesanal. Esto porque tiene menor costo de inversión y por la facilidad de realización (Vilaboa *et al.*, 2011).

3.1.5.2. Incubación: pH final de un producto fermentado o regulado por pH

En el proceso de elaboración de leche agria se lleva a cabo una etapa de fermentación de la leche que ocurre durante un período de incubación. Este proceso contribuye con el aseguramiento de la inocuidad y calidad del producto final, ya que permite controlar el crecimiento y proliferación de microorganismos patógenos y confiere al producto ciertas características sensoriales deseables para el consumidor.

Es por esto que el control del pH final es sumamente importante. Según se detalla en el Cuadro I, la germinación de esporas de *C. botulinum* y el crecimiento de *L. monocytogenes* se logra inhibir

con un pH \leq 4,60 y 4,40 respectivamente (Gibbs, 2009; Bell & Kyriakides, 2009). Asimismo, dichos valores se encuentran dentro del rango de pH normal para leche agria. Por lo tanto, se debe realizar la medición del pH final del producto para que alcance al menos un pH = 4,40 en el menor tiempo posible.

3.1.5.3. Temperatura de almacenamiento

Según Hundy *et al.*, (2016), los productos lácteos fermentados como el yogurt y otros tipos de leche fermentada, deben almacenarse a temperatura de refrigeración ($T \leq 5$ °C). Esto previene el crecimiento y proliferación de bacterias de deterioro y es una barrera para la germinación de esporas de *C. botulinum* y el crecimiento de *L. monocytogenes* (FDA, 2017). Por dicha razón, se debe controlar que el producto final se conserve a no más de 5 °C durante su almacenamiento.

3.1.6. Situación actual de la producción de leche agria en Costa Rica

De acuerdo con la información recopilada por la Cámara Nacional de Productores de Leche (Madriz, 2017), en nuestro país se producen alrededor de 1135 millones de litros de leche anualmente, de los cuales sólo el 60% se procesa a nivel industrial, mientras que el restante 40% se produce a nivel informal o artesanal.

Asimismo, del total de la producción, alrededor de un 7% de la leche producida es destinada para la elaboración de leches fermentadas (1% yogurt, 3% crema ácida y 3% otros) (Madriz, 2017). Sin embargo, no se tiene información acerca de la proporción producida en cada uno de los sectores, ni cuál es el valor correspondiente a la producción de leche agria, como tal, en el sector informal.

Según Viquez (2012), el sector lácteo artesanal se divide en dos tipos: los que pasteurizan la leche y los que la utilizan cruda para la elaboración de distintos productos, incluida la leche agria. El proceso general utilizado, como se observa en la Figura 1 (página 6), consiste en la recepción de la leche, la cual proviene de fincas propias o de productores conocidos de la zona. Seguidamente se realiza un filtrado y un proceso de incubación, en el que sucede lo que anteriormente llamamos como “fermentación natural” y por último el envasado, que puede ocurrir antes o después de la fermentación. Este proceso de elaboración sucede a partir de la microbiota natural de la leche y a temperatura ambiente, la cual varía dependiendo de la zona.

Según el contacto con Torres (2016) de la Asociación de Productores Agropecuarios de Santa Cruz (ASOPROA), alrededor de un 30% de los productores de la zona producen leche agria (~180 productores), sin embargo, no se conoce con exactitud la cantidad de leche agria producida a nivel zonal o nacional, ni de su nivel de ventas o consumo.

No obstante, se presume que este producto es de producción y consumo “propio” en muchos casos, o es producido semanalmente conforme a pedidos locales, según lo conversado con algunos productores y vendedores en la zona de Turrialba, San Ramón, Los Chiles y Golfito, durante el año 2016. Estas ventas a su vez pueden darse por temporadas, como por ejemplo: en época de fiestas locales para la elaboración de platillos típicos como por ejemplo el tamal asado. También se conoce ciertos productores cuyo producto se posiciona en “Ferias del Agricultor” y según comentan algunos vendedores, la leche agria que se consume en Costa Rica es muy popular para la realización de bebidas u otros alimentos en la cocina tradicional costarricense, así como para consumo directo. Asimismo, empresas como Dos Pinos en el sector industrial, también tienen una producción y venta de leche agria, con una producción de aproximadamente 15600 L mensuales (Chacón, 2018).

3.2. Lineamientos de Buenas Prácticas de Manufactura

Los lineamientos de BPM son disposiciones generales sobre las prácticas de higiene y operación durante la industrialización de productos alimenticios, con el fin de garantizar su calidad e inocuidad (RTCA, 2007). Estos son de gran importancia, ya que se parte de la premisa de que los consumidores tienen el derecho de adquirir alimentos que sean inocuos y sanos, y que satisfagan sus expectativas en términos de calidad y precio. Según Jarvis (2014), el conjunto de lineamientos de BPM es una herramienta que pretende garantizar que los alimentos cumplan consistentemente con tales requerimientos.

La base de un sistema de inocuidad alimentaria que se adopta en la industria a nivel mundial, consiste en una combinación de BPM, procedimientos operativos estándar de saneamiento (SSOP) y un sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) (De Oliveira *et al.*, 2016).

En Costa Rica, estos lineamientos están dispuestos en el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.01.33:06 “Industria de Alimentos y Bebidas Procesados. Buenas Prácticas de Manufactura. Principios Generales.” Este contempla desde la ubicación de las instalaciones físicas,

el diseño, abastecimiento, manejo y disposición de desechos, la limpieza y desinfección, el equipo, utensilios, manejo de plagas, el personal, el proceso de elaboración y el registro y documentación de toda labor realizada.

La falta de implementación de las BPM en el sector lácteo artesanal sigue siendo un asunto de suma importancia y urgencia en nuestro país, ya que no se cuenta con las bases para la aplicación de un sistema de gestión para el aseguramiento de la calidad e inocuidad.

4. Materiales y métodos

4.1. Localización

El proyecto se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) y la Escuela de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Agroalimentarias. En ellas se hizo uso de los laboratorios de Química y Microbiología, así como también de la Planta Piloto. Las instituciones mencionadas se ubican en la Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San Pedro, Montes de Oca.

Asimismo, los diagnósticos se llevaron a cabo en las zonas de Turrialba, Golfito y Los Chiles, en las provincias de Cartago, Puntarenas y Alajuela, respectivamente.

4.2. Materias Primas

La materia prima utilizada corresponde únicamente a leche cruda de vaca. Esta es de carácter ordinario, empleada comúnmente en la elaboración de productos lácteos. La leche cruda fue adquirida de un productor nacional de la zona de Guadalupe y fue utilizada en la manera en que se recibió, sin la aplicación de operaciones previas.

Asimismo, para algunos tratamientos se utilizó un cultivo de bacterias lácticas, homofermentativo, cuyo nombre comercial es R704, de la marca Chr. Hansen. Este fue adquirido de un proveedor nacional y se utilizó según se indica en la ficha técnica (Ver anexo 10.3. Detalles de la ficha técnica del cultivo utilizado para la elaboración de leche agria a nivel de planta piloto).

4.3. Actividades preliminares

4.3.1. *Búsqueda, contacto y elección de los productores artesanales de leche agria*

Para la elección de los productores que formaron parte del diagnóstico inicial, se realizó un primer contacto mediante llamadas telefónicas con ayuda de una base de datos del CITA (proporcionada por la Lic. Diana Víquez) que incluía productores de distintas zonas del país, entre ellas: Turrialba, San Carlos, Upala y Golfito. Adicionalmente se logró contactar a un mayor número de productores gracias al apoyo de ASOPROA.

El período de realización de las llamadas comprendió la segunda mitad de julio del 2016 y todo el mes de agosto de ese mismo año. Posterior a la realización de las llamadas se obtuvo una lista de 5 posibles productores en el territorio nacional con disposición de participar en el proyecto. En el Cuadro III se muestra la información de los productores visitados.

Cuadro III. Información de los productores visitados durante la etapa de diagnóstico.

Productor	Ubicación geográfica	Características de la producción de leche agria
A	Santa Cruz, Turrialba, Cartago	Se produce alrededor de 140 L/semana. Agriado natural a temperatura ambiente.
B	Agroindustrial, Golfito, Puntarenas	Las ventas son por pedido. Alrededor de 70 L/semana. Agriado natural a temperatura ambiente.
C	Guadalupe, Goicoechea, San José	Las ventas son por pedido. Alrededor de 10-20 L/semana. Agriado natural a temperatura ambiente.
D	Pavón, Los Chiles, Alajuela	Se produce alrededor de 30 L/semana. La leche se pasteuriza y se agrega un cultivo para el proceso de fermentación.
E	Santa Cruz, Turrialba, San José	Se produce alrededor de 150 L/semana. Agriado natural a temperatura ambiente.

Fuente: elaboración propia.

4.4. Metodología

4.4.1. *Caracterización del proceso de elaboración de leche agria*

4.4.1.1. *Elaboración de una herramienta de evaluación*

La evaluación de las condiciones de producción, así como de la formulación, el proceso de elaboración y el manejo de la leche agria que llevan a cabo en sus empresas los diferentes productores, se realizó con un instrumento que permite realizar una comparación de las formulaciones empleadas, operaciones unitarias aplicadas para la obtención del producto y el cumplimiento de las BPM, según el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA, 2007) y la herramienta elaborada y utilizada por Víquez, (2012) (Ver anexo 10.2. Herramienta para el diagnóstico de los productores de leche agria).

Se realizó al menos una visita por productor, durante la cual, la información requerida para completar este instrumento se obtuvo mediante observación y entrevistas realizadas a los participantes.

4.4.1.2. *Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la leche agria*

Se determinó el pH y el perfil microbiológico (recuento de microorganismos aerobios mesófilos, recuento de mohos y levaduras, recuento de bacterias lácticas y número más probable de *E. coli* genérica como indicador de contaminación fecal) de al menos tres lotes diferentes de la leche agria producida en cada una de las empresas visitadas. Para el tratamiento de los resultados obtenidos en el desarrollo de esta actividad se presentaron los datos como el valor promedio de las mediciones, con su intervalo de confianza al 95%. Esta información se recopiló y analizó de esta forma con el objetivo de obtener una mejor representación de la variabilidad físico-química y microbiológica de las muestras analizadas.

Para la determinación del pH se empleó el método del Laboratorio de Química del CITA “Determinación del pH” P-SA-MQ-012 (CITA, 2016a), basado en el método 981.12 de la AOAC International (AOAC, s.f.). En cuanto a la determinación del perfil microbiológico se usaron los siguientes métodos del Laboratorio de Microbiología del CITA: “Recuento de Mesófilos Aerobios” P-SA-MM-001 (CITA, 2016b), basado en el método del BAM (Bacteriological Analytical Manual, por sus siglas en inglés) para el recuento aerobio en placa (BAM, 2001),

“Recuento de mohos y levaduras” P-SA-MM-007 (CITA, 2016c), basado en la Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, “Recuento de bacterias ácido lácticas” P-SA-MM-006 (CITA, 2016d), basado en el Compendio de métodos para el análisis microbiológico de alimentos (Pouch & Ito, 2001) y “NMP de *Escherichia coli*” P-SA-MM-004 (CITA, 2016e), basado en el método del BAM (BAM, 2002). El montaje de cada uno de los análisis en placa se realizó por duplicado para cada uno de los tres lotes evaluados.

La información recopilada en las empresas y los resultados de la caracterización físico-química y microbiológica de la leche agria, en conjunto con una revisión bibliográfica en el tema, permitieron obtener un panorama acerca de la producción nacional de dicho producto, así como también, de los factores críticos a considerar en el desarrollo de los demás objetivos del presente estudio.

4.4.2. Evaluación de la elaboración de leche agria en planta piloto

4.4.2.1. Elaboración de la leche agria

El producto se elaboró a partir del siguiente flujo de proceso (Solano, 2016; Álvarez, 2016):

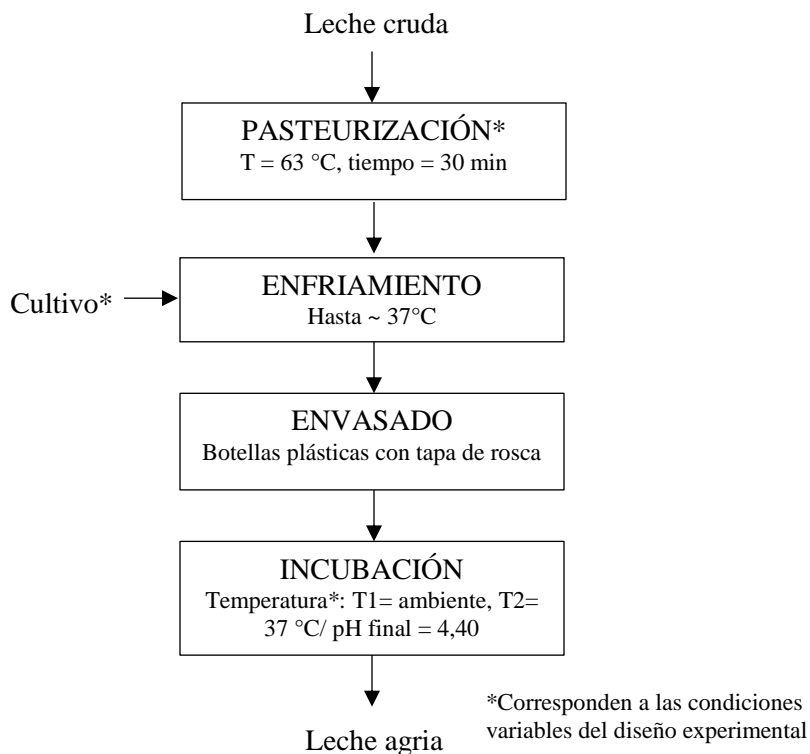


Figura 2. Flujo de proceso para la elaboración de leche agria en planta piloto.

Para la evaluación del proceso de elaboración de leche agria, se simularon las condiciones más comúnmente utilizadas en el sector artesanal (obtenidas a partir de la caracterización realizada en el objetivo 1 de este proyecto) y algunas variaciones de las mismas condiciones.

Según las diferentes fuentes bibliográficas consultadas y el contacto con los productores, las variables críticas del proceso que influyen en la inocuidad del producto terminado, además del grado de cumplimiento de las BPM son: pH final de la leche agria y temperatura de incubación durante el proceso de acidificación/fermentación (Senan & Prajapati, 2015), sin embargo también se consideró importante evaluar el uso o no de algún cultivo iniciador de la fermentación y el impacto de la aplicación de un tratamiento térmico de pasteurización a la leche, dado a que estas corresponden a condiciones de procesamiento que se realizan actualmente en el sector artesanal.

Debido a esta realidad se propuso la realización del siguiente diseño experimental: un irrestricto al azar unifactorial de cinco tratamientos dados por la combinación de las condiciones que se muestran en el Cuadro IV.

Cuadro IV. Tratamientos y condiciones a utilizar para la determinación de la curva de acidificación (fermentación) correspondiente al segundo objetivo de este proyecto.

Tratamiento	Condiciones			Abreviatura
	Pasteurización	Temperatura (°C)	Cultivo	
1	No	Ambiente	No	SP SC A (Sin pasteurización, sin cultivo, a temperatura ambiente)
2	No	Ambiente	Sí	SP CC A (Sin pasteurización, con cultivo, a temperatura ambiente)
3	No	37	Sí	SP CC 37 (Sin pasteurización, con cultivo, a temperatura 37 °C)
4	Sí	Ambiente	Sí	P CC A (Pasteurización, con cultivo, a temperatura ambiente)
5	Sí	37	Sí	P CC 37 (Pasteurización, con cultivo, a 37 °C)

Fuente: elaboración propia

4.4.2.2. Determinación de la curva de acidificación

Se midió la temperatura ambiente en la que se llevó a cabo la fermentación por medio de un termo registrador y se utilizó el cultivo láctico iniciador bajo las especificaciones reportadas en la ficha técnica. Bajo estas condiciones, se realizaron tres repeticiones de cada uno de los tratamientos, utilizando un lote de leche distinto, de manera aleatoria, para cada repetición del mismo tratamiento.

Se determinaron los cambios de pH durante todo el proceso de fermentación de la leche hasta alcanzar un pH de 4,4, puesto que bajo estas condiciones se inhibe el crecimiento de los patógenos *Listeria monocytogenes* y la germinación de esporas de *Clostridium botulinum* (Aureli *et al.*, 2003; Buchrieser & Rocourt, 2007). Para esto se utilizó un pHmetro con electrodo de vidrio de Hanna Instruments marca HALO. Se determinó el espaciamiento mínimo necesario entre las mediciones para la obtención de la curva de acidificación mediante la realización de pruebas preliminares en las que se evaluó el proceso de disminución del pH una vez para cada uno de los tratamientos, iniciando con intervalos de medición de 15 min según la metodología utilizada por Kristo *et al.*, (2003) y distanciando las mediciones de cada tratamiento en al menos 15 min (Ver anexo 10.5. Resultados preliminares).

A partir de las curvas obtenidas se calculó como variable respuesta el tiempo en que la leche fermentada alcanza el valor de pH de 4,4 (t_f) mediante el uso de un modelo logístico de 4 parámetros. En el programa estadístico JMP 13 se escogió el modelo de mejor ajuste que cumpliera con las siguientes características:

- Ajuste adecuado a la curva, determinado por medio de una inspección visual
- El valor de R^2 por encima de 0,9
- Capaz de calcular t_f por medio de una predicción inversa
- Ausencia de patrones claros entre los puntos en la gráfica de Residuos contra Predichos

Para analizar estos resultados, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANDEVA), así como también una comparación por medio de contrastes ortogonales con un nivel de significancia del 5% (Youssef *et al.*, 2016) para los promedios de t_f para cada uno de los tratamientos, esto para poder observar el efecto del uso de cultivo láctico como iniciador de la fermentación, el efecto de la pasteurización de la leche previo al período de fermentación y el efecto de la temperatura de incubación. Asimismo se graficaron los datos (pH vs. Tiempo (h)) de todos los tratamientos en una misma figura.

4.4.2.3. Determinación de la curva de crecimiento de bacterias lácticas

Se determinó la curva de crecimiento de BAL durante el proceso de fermentación de la leche en los diferentes tratamientos propuestos (ver Cuadro I). Para esto se siguió el mismo procedimiento utilizado para la caracterización de la leche agria de los diferentes productores (P-SA-MM-006), el cual consiste en realizar las diluciones seriadas correspondientes (primero 25 g de la muestra en 225 mL de agua peptonada estéril (APE) al 0,1% y seguidamente 1 mL en tubos de 9 mL de APE), posteriormente todas las muestras se montaron en placas de Petri por duplicado utilizando la técnica de vaciado en agar MRS (Naghili *et al.*, 2013) y finalmente se dio un período de incubación en jarras de anaerobiosis a una temperatura de 35 °C por 72 ± 2 h.

En la determinación de estas curvas de crecimiento, se realizaron al menos 5 puntos de muestreo a lo largo del proceso de fermentación. Los tiempos de muestreo se seleccionaron una vez que se obtuvo la curva de acidificación del producto (Sección 5.4.2.2.).

Para el análisis de resultados se calculó el logaritmo base 10 de los recuentos de BAL y el promedio de dichos valores logarítmicos de las tres repeticiones de cada tratamiento, junto con el intervalo de confianza al 95% correspondiente. Seguidamente se graficaron los datos \log_{10} BAL (UFC/g) vs. Tiempo (h) de todos los tratamientos en una misma figura.

4.4.3. Transferencia de la información a los productores

4.4.3.1. Diseño de un taller de capacitación

La transferencia de los principales resultados obtenidos en la investigación, así como de las oportunidades de mejora detectadas, respondió fundamentalmente al conocimiento de los parámetros críticos requeridos para una producción inocua de leche agria artesanal que se obtuvieron en el cumplimiento de los objetivos 1 y 2 del presente proyecto. Esta transferencia se realizó mediante un taller de capacitación con cada uno los productores artesanales de leche agria que participaron en el proceso de diagnóstico y caracterización del producto (ver Cuadro III).

La finalidad del taller fue que los participantes logaran apropiarse del aprendizaje como fruto de los distintos procesos de análisis, revisión y discusión que se dan alrededor de una participación colectiva y participativa, características de este tipo de evento de capacitación (Candelo *et al.*, 2003). Se hizo uso de metodologías formativas, críticas y motivadoras que lograron principalmente el compartir de experiencias propias entre los participantes (Pulgar, 2005).

Para el diseño del taller, de acuerdo con lo sugerido por Candelo *et al.*, (2003), se siguieron los siguientes pasos:

- *Análisis previo de las necesidades:* se analizaron las posibles causas del problema en cuestión y se identificaron las posibles soluciones (responde a los resultados obtenidos al llevar a cabo el objetivo 1 y 2 del presente trabajo de investigación).
- *Evaluación de las necesidades del grupo afectado o beneficiado:* se determinaron las condiciones del grupo que se ve “afectado” por el problema (en este caso, serían los productores de leche agria). Se tomaron en cuenta factores como: traslado, costo, grado de escolaridad, número de participantes, comodidad del lugar de realización de la capacitación y disponibilidad de tiempo. Asimismo se tomó en cuenta la posibilidad de que hubiese otras personas u organizaciones con algún tipo de interés en la elaboración del taller (como por ejemplo: ASOPROA).
- *Elaboración del plan de trabajo:* se determinaron los distintos aspectos prácticos como tareas, cronograma con fechas límite, lugar, fecha, y comunicación de la información, presupuesto, tecnología necesaria y materiales, así como también la definición del enfoque temático, los objetivos y el contenido que se quería abarcar.
- *Diseño del programa:* se elaboró la agenda y la estructura modular del taller, que corresponde a cada una de las actividades, la duración, las distintas herramientas, horario y el tipo de evaluación.

4.4.3.2. Desarrollo del taller de capacitación

La realización del taller propuesto en la etapa de diseño y organización, consideró los aspectos presentados en el Cuadro V.

Cuadro V. Información general del taller de capacitación.

Tipo de actividad	Taller
Título	Inocuidad en la producción de leche agria
Objetivo general	Comprender la importancia de la pasteurización, la medición y el monitoreo de parámetros de control y del cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) para el aseguramiento de la inocuidad durante el proceso de elaboración de leche agria.
Objetivos específicos	<ul style="list-style-type: none">• Conocer el efecto de la acidificación sobre distintos patógenos de referencia en productos lácteos fermentados para el establecimiento de parámetros de control que aseguren la inocuidad del producto.• Aprender un proceso de elaboración de leche agria que permita la obtención de un producto inocuo.• Reconocer oportunidades de mejora en cuanto a la aplicación de las BPM en el proceso de producción, para su posterior aplicación.
Perfil de los participantes	Esta actividad es dirigida a productores de leche agria artesanal en distintas zonas del país. Ellos son los encargados de elaborar y comercializar el producto. Estas personas son adultas con edades entre los 25 y 65 años aproximadamente. Además, tienen un nivel de educación muy variado, algunos no han completado la escuela. Sin embargo, es importante rescatar que han recibido cursos de BPM y en algunos casos capacitaciones del Instituto Nacional de Aprendizaje (INA).

Fuente: elaboración propia

Para responder a los objetivos, se llevaron a cabo distintas actividades durante la aplicación del taller (Ver Anexo 10.6. Material utilizado en el taller de capacitación y el Cuadro VI). Entre ellas se encuentran: presentarles el informe de la visita de diagnóstico a cada una de las empresas del estudio, la guía de proceso para la elaboración de leche agria inocua y la hoja de control del proceso de elaboración de leche agria.

El informe de la visita presentaba de manera resumida la información que fue recolectada en la visita a la empresa, mediante consultas y observación por parte de la proponente, con el objetivo de mostrarles las oportunidades de mejora en cuanto a la aplicación de BPM y el grado de cumplimiento de las distintas secciones del RTCA 67.01.33:06. Asimismo se detallaron los

resultados de los análisis microbiológicos realizados a las distintas muestras de leche agria que admitieron a evaluación los distintos productores y las posibles causas de los resultados encontrados.

La guía de proceso elaborada explicaba detalladamente los pasos a seguir para la elaboración de leche agria inocua, desde la recepción de la materia prima, hasta el envasado y almacenamiento. Esta se elaboró tomando en cuenta los resultados obtenidos en el segundo objetivo específico del presente estudio (ver sección 6.2.).

Por último, se elaboró un ejemplo de hoja de control para que pudiera ser usada por los productores durante el proceso de elaboración de leche agria. Esta incluía todos los parámetros de control por etapas, así como también el registro de otras variables importantes como: nombre del operario, hora de inicio, lote de materia prima y un espacio para realizar observaciones.

En el Cuadro VI se resumen los detalles de contenido, técnica de enseñanza y materiales utilizados para el desarrollo del taller.

Cuadro VI. Resumen de los contenidos del taller de capacitación.

Tiempo (min)	Tema	Contenido	Técnica de enseñanza	Materiales*
15	Introducción	Presentación del expositor y los participantes. Objetivos de la capacitación y contenido del taller. Explicación del proyecto y evaluación del conocimiento previo.	Charla participativa	Carpeta Formulario escrito
30-45	Conceptos de importancia y su implicación en la elaboración de leche agria	Definiciones de: - BPM - Inocuidad - Bacterias patógenas - pH - Leche agria Efecto del pH en la inocuidad de productos lácteos fermentados. Bacterias patógenas de importancia en la elaboración de leche agria.	Charla participativa	Presentación (carteles) Carpeta
15	Informe de la visita de diagnóstico a la empresa	Revisión de los resultados del diagnóstico de BPM, el perfil microbiológico y los valores de pH de las muestras de leche agria del productor.	Charla participativa	Carpeta
30	Proceso de elaboración de leche agria	Guía de proceso para la elaboración de leche agria inocua.	Charla participativa	Carpeta: Guía de proceso
15	Oportunidades de mejora en BPM y proceso	Actividad: Caso de un día de producción de leche agria. Hoja de control del proceso de elaboración de leche agria	Charla participativa, material didáctico (evaluación de un caso)	Carpeta: Actividad para el uso de la hoja de control. Hoja de control.
20	Evaluación	Evaluación de la capacitación Evaluación de la capacitadora	Trabajo individual	Formulario escrito

Fuente: elaboración propia. *Ver Anexo 9.6 Material utilizado para el taller de capacitación.

4.4.3.3. Evaluación del taller de capacitación

Para evaluar la efectividad del taller de capacitación, se realizaron dos pruebas: una al inicio y una al final. Estas consistían en una serie de preguntas de selección única que abarcaban los temas más importantes del taller, previamente definidos.

Ambas evaluaciones constaron de las mismas preguntas. El propósito de la primera era conocer el nivel de conocimiento de los participantes en conceptos básicos, como lo son: acidez, pH, temperatura, inocuidad, microorganismos patógenos, BPM y el proceso de elaboración de leche agria. Con la segunda evaluación se midió el nivel de aprendizaje después de haberse llevado a cabo la actividad de capacitación.

Por último se aplicó la herramienta “Evaluación de cursos” R-CA-006 (CITA, 2016f) para evaluar la satisfacción de los participantes en el taller. En esta se abarcan aspectos como el grado de cumplimiento de los objetivos, contenido, metodología, recursos, coordinación y espacio físico, así como también las oportunidades de mejora.

4.4.3.4. Análisis estadístico de los resultados de las evaluaciones

Para el análisis de los resultados obtenidos de las evaluaciones realizadas por los productores participantes en el taller, se realizó una prueba de hipótesis para comprobar que la diferencia ($\mu_D - \mu_A$) del promedio de aciertos después de la realización del taller con el promedio de aciertos obtenidos antes del desarrollo del taller era significativamente mayor que cero. Se planteó las siguientes hipótesis:

- $H_0: \mu_D - \mu_A = 0$
- $H_A: \mu_D - \mu_A > 0$

Se esperaba que $\mu_D - \mu_A$ fuera significativamente mayor que 0, puesto que se deseaba corroborar el grado de aprendizaje obtenido durante el taller. Se evaluó a un total de 13 personas (26 evaluaciones en total) y el análisis se realizó con un nivel de confianza del 95% y con valores p menores a 0,05 para la cola mayor que.

Para la herramienta (“Evaluación de cursos” R-CA-006) con la que se evaluó la satisfacción del curso se utilizó únicamente estadística descriptiva.

5. Resultados y discusión

5.1. Descripción y caracterización del proceso de elaboración de leche agria artesanal producida en Costa Rica

5.1.1. *Diagnóstico de Buenas Prácticas de Manufactura*

Como parte inicial del proceso de evaluación de la producción de leche agria se realizó un diagnóstico, a los distintos productores artesanales, que voluntariamente participaron del estudio. En el Cuadro VII se presenta un resumen de la información y algunas características importantes acerca del manejo de la leche como materia prima. Además se pueden observar algunas características importantes de los productores visitados, como son: la ubicación geográfica, que varía significativamente entre los productores (a excepción de A y E), no solamente se encuentran en distintas provincias sino también en distintas zonas socioeconómicas de nuestro país, asimismo varía la altitud, el clima, el acceso y primordialmente la escala a la que se desarrolla la ganadería lechera (Vilaboa *et al.*, 2011).

La región Huetar Norte de nuestro país, que incluye la zona de Los Chiles en la que se encuentra el productor D es la primera productora de leche con una producción estimada en 600 mil kilogramos diarios y la segunda con mayor cantidad de ganado del país. La temperatura promedio anual en Los Chiles es de 22 a 31 °C, con una humedad relativa entre 70 y 90% (Vilaboa *et al.*, 2011; Hidalgo *et al.*, 2004).

Cuadro VII. Información de los productores visitados durante el diagnóstico y sus características en cuanto al manejo de la leche como materia prima.

Productor	Ubicación geográfica	Cantidad de empleados	Cantidad de leche que procesa	Productos que elabora	Características de la materia prima (leche)								
					Producción propia		Tipo de ordeño		Control veterinario (SENASA)		Control fisicoquímico (Ekomilk)		Temperatura de recepción de la leche (°C)*
					Sí	No	Manual	Mecánico	Sí	No	Sí	No	
A	Santa Cruz, Turrialba, Cartago	3	1500-1700 L/semana	Queso fresco (tipo Turrialba), queso palmito, yogurt, natilla, leche agria, quesos maduros y semiduros.	X			X	X		X		6-8 °C
B	Agroindustrial, Golfito, Puntarenas	8	300 L/día	Cuajada, queso fresco, queso maduro, queso mozzarella, queso salado, queso palmito, dulce de leche, natilla, leche agria, rompopo y helados.		X	X			X		X	Ambiente (NR)

*Se acepta la leche a temperatura ambiente (solamente si fue ordeñada no más de 2 h antes de la recepción) o a temperatura de refrigeración (≤ 5 °C), **Su producción de leche se encuentra en Los Ángeles, San Ramón, Alajuela. En esta planta realizan solamente los productos mencionados ***NR: no realizan medición.

Cuadro VII. Continuación.

Productor	Ubicación geográfica	Cantidad de empleados	Cantidad de leche que procesa	Productos que elabora	Características de la materia prima (leche)								
					Producción propia		Tipo de ordeño		Control veterinario (SENASA)		Control fisicoquímico (Ekomilk)		Temperatura de recepción de la leche (°C)*
					Sí	No	Manual	Mecánico			Sí		
C	Guadalupe, Goicoechea, San José**	2	NR***	Mantequilla, yogurt y leche agria.	X			X	X			X	Refrigeración (NR)
D	Pavón, Los Chiles, Alajuela	4	1000 L/día	Yogurt, queso fresco, leche agria, queso mozzarella, queso palmito, natilla, helados y dulce de leche.		X	X	X		X	X		Ambiente (NR)
E	Santa Cruz, Turrialba, Cartago	3	NR***	Queso fresco y leche agria	X			X	X			X	Ambiente (NR)

*Se acepta la leche a temperatura ambiente (solamente si fue ordeñada no más de 2 h antes de la recepción) o a temperatura de refrigeración (≤ 5 °C), **Su producción de leche se encuentra en Los Ángeles, San Ramón, Alajuela. En esta planta realizan solamente los productos mencionados ***NR: no realizan medición.
Fuente: elaboración propia.

Seguidamente, se encuentra la región Central, en la que se ubican los productores A, C y E. En la zona de Turrialba, la temperatura anual promedio oscila entre 15 a 26 °C y en la zona de San Ramón de Alajuela la temperatura anual promedio es de 18 a 28 °C. Además esta región es de topografía irregular y presenta una humedad relativa promedio de 85%. Se observan a su vez cuatro zonas productoras, la de lechería especializada con presencia de climas fresco-lluvioso durante todo el año (bosque húmedo), la zona media de lechería, con lluvias de mayo a noviembre y veranillo en julio, la zona productiva de bajura húmeda (de influencia atlántica) que se desarrolla con presencia de lluvia durante todo el año y la zona productiva de bajura húmeda (de influencia pacífica) que se ubica en la misma latitud que la de influencia atlántica pero presenta un periodo de verano (6-7 meses) en el que varía la temperatura, la humedad y el clima (Hidalgo *et al.*, 2004).

Por último, el productor B se encuentra ubicado en la región Brunca, la cual abarca un 13% de la producción nacional, mientras que la región Huetar Norte junto con la región Central abarcan más del 70%. La región Brunca se caracteriza por una producción dirigida al comercio artesanal, como es el caso del productor B. Ellos se encuentran en la zona llamada Agroindustrial de Golfito, que se caracteriza por una temperatura anual promedio de 23 a 32 °C y una humedad relativa promedio de 77 a 83% y según Alfaro (2016), esta es una zona de difícil acceso lo cual dificulta la compra de insumos y materiales, así como la recepción de asesoría y capacitación.

Por otro lado, en el mismo cuadro se pueden observar algunas características referentes a la producción y manejo de la leche por parte de cada productor. A grandes rasgos, es en su mayoría de producción propia y obtenida mediante un ordeño mecánico. Asimismo, cada productor realiza el control veterinario al ganado (a excepción del productor D, lo cual es razonable dado que la producción no es propia), además tres de los cinco productores procura realizar un control fisicoquímico a la leche que ingresa a su planta de producción. Por último, en su mayoría no se realiza un control de la calidad de la leche o el producto por medio de la medición de la temperatura a la que ingresa la leche a las plantas de producción y durante su procesamiento.

En el Cuadro VIII se muestran los resultados del diagnóstico de BPM con base en el Reglamento Técnico Centroamericano de Buenas Prácticas de Manufactura RTCA 67.01.33:06, obtenidos a partir de la evaluación realizada en las visitas a cada productor artesanal de leche agria.

Cuadro VIII. Grado de cumplimiento de las BPM según las distintas secciones del reglamento de referencia.

Productor	Grado de cumplimiento de los requisitos de evaluación de las BPM (%)									Nota final*
	Edificio						Equipo, utensilios y personal	Proceso y producción	Almacenamiento y distribución	
	Alrededores y ubicación	Instalaciones físicas	Instalaciones sanitarias	Manejo y disposición de desechos	Limpieza y desinfección	Control de plagas				
A	42,8	66,7	48,3	28,6	66,7	0,0	76,0	78,6	28,6	46,5
B	27,3	53,8	58,6	28,6	33,3	0,0	56,0	21,4	42,8	36,0
C	13,3	34,7	19,1	21,6	25,7	0,0	45,3	11,6	33,3	6,0
D	42,8	46,1	67,0	42,8	100	50,0	52,0	85,7	57,1	42,5
E	0,0	17,9	10,3	0,0	0,0	0,0	44,0	7,1	40,0	0,0

*La nota es asignada según el sistema de puntos del RTCA sobre una base de 100 puntos (81 puntos es la nota mínima para aprobar el funcionamiento de las instalaciones y una nota < 60 se considera en condiciones inaceptables).

Fuente: elaboración propia.

Se observa el grado de cumplimiento de las BPM por sección del RTCA 67.01.33:06, y la calificación final otorgada según los resultados obtenidos del diagnóstico de BPM. Al observar las notas finales obtenidas, puede notarse que todos los productores en el estudio obtienen una nota menor a 60,0 y según el reglamento (RTCA, 2007), una nota inferior a 60,0 se considera inaceptable y se debe recomendar el cierre de las instalaciones. Esto es un factor sumamente preocupante en el ámbito de inocuidad alimentaria, sobre todo si se toma en cuenta que la situación podría agravarse en puntos de venta, tales como ferias del agricultor.

En cuanto al grado de cumplimiento por parte de cada productor en las distintas secciones del reglamento, se puede observar que en su mayoría, el menor grado de cumplimiento se da en las secciones de “Control de plagas”, en el “Manejo y disposición de desechos” y en “Alrededores y ubicación”.

También se puede observar que, como en el caso del productor E, sin importar el grado de cumplimiento en las diferentes secciones, su nota final es cero, puesto que el reglamento sigue un sistema de puntos que difiere del cumplimiento individual de cada parámetro, sino que se da la suma de puntos por categorías y con un mínimo en el número de parámetros cumplidos dentro de cada categoría.

En general, las notas más bajas las obtuvieron los productores C y E. Estos son los que producen de forma más informal y únicamente por pedido. El productor C a su vez, tiene una planta de producción principal en otra zona del territorio nacional y la producción de leche agria la realizan en una casa localizada en la GAM que han ido adecuando para la producción. Sin embargo, al ser una estructura diseñada y construida como vivienda, no cuenta con el diseño ni los materiales de construcción apropiados para una industria de alimentos. Tampoco cuenta con barreras contra la entrada de contaminantes, no tiene una ventilación ni iluminación apropiada y existe una gran cantidad de focos de contaminación en los alrededores, ya que hay tránsito de personas, vehículos y animales.

Por otra parte, el recinto de producción con el que cuenta el productor E, se encuentra próximo a su lugar de vivienda y a la lechería. La planta de producción consiste de un único cuarto que cuenta con una pila y una marmita de acero inoxidable. No tiene cielo raso, tiene puertas y ventanas sin protección y el diseño y el material no es el adecuado para la producción de alimentos. También se observó que no se utiliza ningún tipo de indumentaria especial (gabacha, botas, cofia, tapabocas, etc.) para trabajar en la zona de producción, ni cuentan con un sistema de limpieza y desinfección

de manos y botas, previo al ingreso. Por último se observó que también existe un gran número de fuentes de contaminación en los alrededores por el tránsito y presencia constante de animales, vehículos y personas.

En cuanto a los productores A, B y D, su planta tiene un mejor diseño y construcción. En su mayoría cuentan con materiales apropiados y de fácil limpieza y desinfección. Sin embargo, se encuentran ubicadas en zonas verdes, en las que hay tránsito de animales y personas, o inclusive cerca de una zona en la que hay viviendas de personas. Asimismo, A y D cuentan con barreras en puertas y ventanas contra la entrada de roedores o insectos, pero con regularidad mantienen las puertas abiertas durante los turnos de producción. En el caso de B, no cuentan con barreras para la entrada de roedores o insectos.

A continuación, en el Cuadro IX se observa un resumen de las condiciones de procesamiento de la leche agria de los distintos productores visitados:

Cuadro IX. Condiciones de procesamiento de la leche agria.

Productor	Pasteurización	Adición de cultivo	Temperatura de incubación
A	No	No	Ambiente (no hay control)
B	No	No	Ambiente (no hay control)
C	No	No	Ambiente (no hay control)
D	Sí	Sí	Ambiente (no hay control)
E	No	No	Ambiente (no hay control)

Fuente: elaboración propia.

Se observa primeramente un resumen de las condiciones bajo las cuales se elabora la leche agria en los distintos establecimientos visitados durante el diagnóstico (ver anexo 10.4. Flujo de proceso para la elaboración de leche agria de los distintos productores visitados). La principal diferencia se observa con el productor D, el cual es el único que realiza operaciones previas al proceso de fermentación, tales como: descremado, estandarización y un tratamiento térmico a la leche (pasteurización), también hace uso de cultivo láctico para que se lleve a cabo la fermentación de la leche después de la pasteurización. Esto se debe a que el dueño de la empresa (que también es el encargado de producción) ha recibido formación en el área de tecnología de alimentos.

Los demás productores llevan a cabo una producción de leche agria más “tradicional”, realizando una fermentación natural a partir de leche cruda y a temperatura ambiente. Los productores A, B y E primero realizan el envasado y después el proceso de incubación en el que

se lleva a cabo la fermentación de la leche, mientras que, C y D realizan el proceso de incubación (mantienen toda la leche en un mismo recipiente) y al finalizar el tiempo estimado (en el caso de C es de aproximadamente 48 h y D de un día para otro), proceden a envasar. Asimismo, B y E utilizan botellas plásticas reutilizadas para envasar, mientras que A, C y D utilizan botellas nuevas.

Otra diferencia en la producción de leche agria de los distintos productores, es la temperatura de incubación. Esta difiere, por razones obvias, puesto que los productores se encuentran ubicados en distintas zonas de nuestro país, en las cuales varían las condiciones climáticas y por lo tanto es variable la temperatura ambiente, el tiempo de incubación y las características de la leche agria obtenida como producto final.

Los productores visitados en su totalidad, producían otra variedad de productos lácteos además de la leche agria (ver Cuadro VII). En su mayoría, se dedican a la producción de varios tipos de queso fresco, así como también de yogurt y natilla mayormente. La producción de leche agria varía en algunos casos entre los 6-20 L semanales y en otros, la producción no es semanal, sino según pedidos.

5.1.2. Perfil fisicoquímico y microbiológico de la leche agria analizada

En el Cuadro X se muestran los resultados de los análisis microbiológicos realizados como parte de la determinación del perfil microbiológico y de la determinación de pH de las muestras de leche agria de los distintos productores visitados.

Cuadro X. Perfil microbiológico y los valores de pH de las muestras de leche agria de los productores artesanales visitados en el presente estudio.

Productor	pH	Recuento Total (Log(UFC/g))	Recuento de mohos y levaduras (Log(UFC/g))	Recuento de bacterias ácido lácticas (Log(UFC/g))
A	4,5 ± 0,2	8,9 ± 0,6	4 ± 1	8,5 ± 0,9
B	4,2 ± 0,2	9,2 ± 0,3	4,8 ± 0,9	9,13 ± 0,06
C	4,5 ± 0,2	8,6 ± 0,5	5,3 ± 0,7	8,4 ± 0,4
D	4,28 ± 0,05	8,1 ± 0,6	5,8 ± 0,5	8,0 ± 0,6
E	4,3 ± 0,1	9,1 ± 0,1	4,4 ± 0,9	9,1 ± 0,1

Se indica el intervalo de confianza al 95% (± IC). Fuente: elaboración propia.

Se observa que los valores de pH oscilan entre 4,7 y 4,0 aproximadamente, siendo A y C los productores cuya leche agria presenta los valores más altos y B los más bajos. Como se mencionó anteriormente, el pH es el parámetro de control en el proceso de fermentación de este producto y su control en la producción es de suma importancia dada su influencia sobre la sobrevivencia de distintos microorganismos patógenos relevantes en este producto.

Dichos valores pueden significar la sobrevivencia, presencia o capacidad de crecimiento de microorganismos patógenos como por ejemplo *L. monocytogenes*, o la posible germinación de esporas de *C. botulinum*. Cabe resaltar que, sin importar el método de elaboración empleado por el productor, se puede alcanzar valores de $\text{pH} \leq 4,4$ en el producto terminado, sin embargo, para esto se debe tener control sobre este parámetro y el equipo idóneo para su medición. Asimismo, el tiempo para alcanzar este valor de pH debe ser el mínimo posible, idealmente un periodo inferior a las 24 h (FDA, 2017).

En el mismo cuadro se puede observar los valores de recuento total aerobio mesófilo (RT), mohos y levaduras (MyL) y bacterias ácido lácticas (BAL) obtenidos a partir de las mismas muestras de leche agria analizadas. Los valores de RT y BAL concuerdan con lo reportado en la literatura. Según Narvhus & Gadaga (2003), el RT en leches fermentadas se encuentra entre 6-10 log (UFC/g) y el de BAL entre 8-10 log (UFC/g). Sin embargo, de forma positiva, se obtuvieron recuentos de mohos y levaduras inferiores a 5-8 log (UFC/g), valores que se reportan en la literatura. Por lo tanto, dado que este tipo de microorganismos son ubicuos y provienen del aire, utensilios y contaminación en el ambiente, se puede considerar como valores normales en las condiciones analizadas (Moatsou & Moschopoulou, 2015).

Por último, en el Cuadro XI se muestran los resultados de número más probable (NMP) de *E. coli* para todas las muestras de leche agria evaluadas por productor.

Cuadro XI. NMP de *E. coli* de las muestras de leche agria de los distintos productores visitados en el presente estudio.

Productor	Muestra	NMP <i>E. coli</i> (NMP/g)
A	1	> 1100
	2	< 3,0
	3	1100
	4	> 1100
B	1	> 1100
	2	> 1100
	3	> 1100
	4	460
C	1	> 1100
	2	> 1100
	3	360
D	1	240
	2	230
	3	< 3,0
	4	< 3,0
E	1	150
	2	> 1100
	3	> 1100

Fuente: elaboración propia.

Se observa que al menos una de las muestras analizadas, por productor, obtuvo resultados positivos en cuanto a la presencia de *E. coli* y confirmación de *E. coli* genérica. Estos resultados sugieren la presencia de contaminación fecal en la materia prima, mientras que, en el caso del productor D, la contaminación del producto después de la pasteurización. Esto evidencia, así como sugiere Gran *et al.*, (2002), que las BAL aunque son capaces de producir ácidos orgánicos y por lo tanto causan el descenso de pH, no necesariamente son capaces de inhibir el crecimiento y la sobrevivencia de *E. coli*.

Según el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 “Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de Alimentos” (RTCA, 2009) el límite máximo permitido de *E.coli* para productos lácteos como yogurt o similares a cremas ácidas es < 3 NMP/g. Sólo tres de las muestras cumplen con lo establecido en dicho reglamento, lo cual reitera la importancia de la implementación adecuada de las prácticas de higiene, tanto durante el ordeño y la distribución de la leche, como durante todas las etapas del proceso de elaboración.

5.2. Determinación del tiempo en que la leche agria alcanza un pH = 4,4 y las curvas de acidificación y de crecimiento de BAL

En el Cuadro XII se observa el tiempo estimado para alcanzar un pH de 4,4 en leche agria para los distintos tratamientos evaluados, asimismo, en el Cuadro XIII se pueden observar las distintas probabilidades obtenidas para la prueba de contrastes ortogonales aplicada a dichos valores de tiempo.

Cuadro XII. Tiempo estimado en horas en el que la leche agria, elaborada bajo distintas condiciones (pasteurización, uso de cultivo láctico y temperatura de incubación), alcanza un valor de pH = 4,4.

Tratamiento	Tiempo estimado (h) en que alcanza pH = 4,4
Leche sin pasteurizar, sin cultivo y a temperatura ambiente (SP SC A)**	68 ± 12
Leche sin pasteurizar, con cultivo y a temperatura ambiente (SP CC A)**	16 ± 3
Leche sin pasteurizar, con cultivo y a una temperatura de 37 °C (SP CC 37)	9 ± 1
Leche pasteurizada, con cultivo y a temperatura ambiente (P CC A)**	14 ± 1
Leche pasteurizada, con cultivo y a una temperatura de 37 °C (P CC 37)	9 ± 1

* Se reporta el promedio del tiempo ± el intervalo de confianza al 95%. ** La temperatura ambiente promedio fue de 24 °C. Fuente: elaboración propia.

Cuadro XIII. Resultados de la prueba de contrastes ortogonales para determinar el efecto del uso de cultivo láctico, la pasteurización de la leche y la temperatura de incubación sobre el tiempo estimado en horas en que la leche alcanza un pH = 4,4.

Contraste	Efecto	Valor p
SP SC A vs. SP CC A, SP CC 37, P CC A y P CC 37	Uso de cultivo láctico	0,0000000058*
SP CC A, SP CC 37 vs. P CC A, P CC 37	Pasteurización	0,7865
SP CC A vs. SP CC 37	Temperatura de incubación	0,0981
P CC A vs. P CC 37		0,2209

*Valores p < 0,05 indican que existe diferencia significativa. Los resultados se reportan con un nivel de confianza del 95%. Fuente: elaboración propia.

En las Figuras 3 y 4 se observan las curvas de acidificación y de crecimiento de BAL, respectivamente, para los mismos tratamientos mencionados en el Cuadro XII.

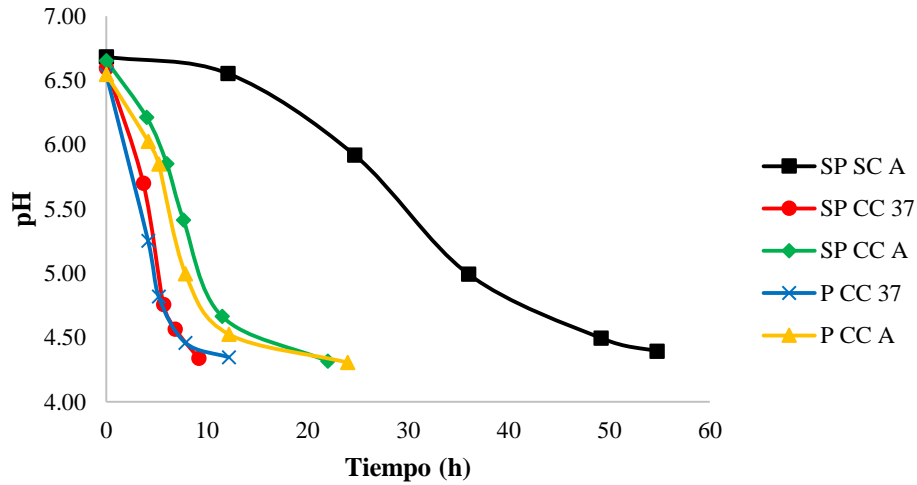


Figura 3. Curva de acidificación del proceso de fermentación para la elaboración de leche agria bajo distintas condiciones.

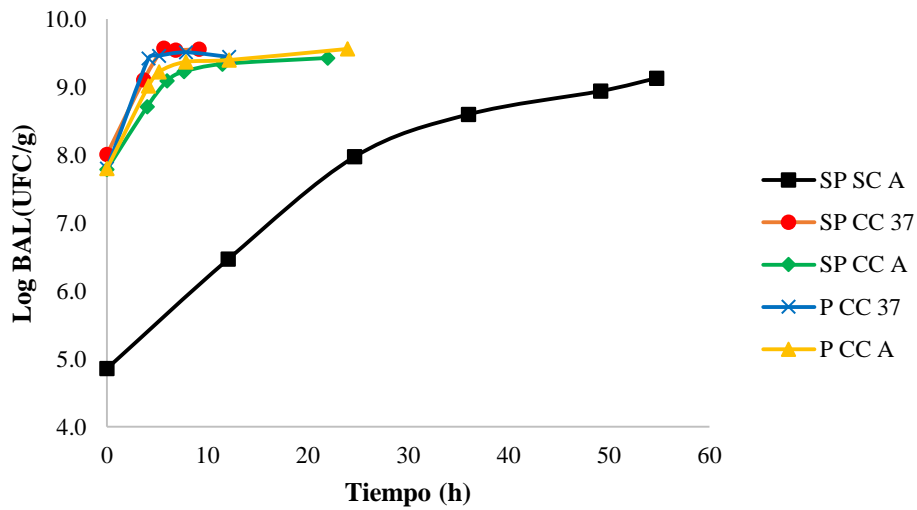


Figura 4. Curva de crecimiento de BAL del proceso de fermentación para la elaboración de leche agria bajo distintas condiciones.

En el Cuadro XII se observa el tiempo necesario para alcanzar un pH de 4,4 con un nivel de confianza del 95%. Estos tiempos muestran que el proceso más largo sucede al llevarse a cabo una fermentación natural (leche sin pasteurizar, sin adición de cultivo y a temperatura ambiente), lo cual era el resultado esperado, ya que como se había comentado anteriormente, el uso de cultivos permite acelerar los procesos de fermentación. Lo mismo se observa al tomar en cuenta el valor p obtenido al comparar dicho tratamiento (SP SC A) contra el resto de los tratamientos (ver Cuadro XIII), dicho contraste permite evaluar el efecto del uso de cultivo láctico como iniciador del proceso de fermentación sobre el tiempo en que se alcanza un pH = 4,4. El valor observado es menor que 0,05 y por lo tanto, se puede afirmar bajo las condiciones evaluadas en este estudio, que el uso de cultivo láctico como iniciador del proceso de fermentación durante el proceso de elaboración de leche agria, es beneficioso, puesto que permite alcanzar el valor de pH deseado en menor tiempo.

Al comparar los dos tratamientos en los que se pasteuriza la leche previo a la adición de cultivo, contra los que no se lleva a cabo la pasteurización, no se encuentra diferencia significativa en el tiempo que se tarda en alcanzar un pH = 4,4. De este resultado, se puede inferir que la microbiota endógena de la leche no actúa en el proceso de fermentación de igual forma que el cultivo láctico adicionado. La hipótesis que se forma a partir de este resultado, es que la microbiota del cultivo láctico actúa de manera predominante y es la que causa el descenso de pH, mientras que la microbiota endógena no logra competir por el sustrato de la fermentación.

Los últimos dos contrastes realizados permiten comparar las diferentes temperaturas de incubación a las que se llevó a cabo el proceso de fermentación: una temperatura ambiente promedio de 24 °C y una temperatura controlada de 37 °C. En ambos casos el valor p resultó mayor que 0,05. Lo cual quiere decir que la temperatura de incubación no influye de manera significativa sobre el tiempo en que se alcanza un pH = 4,4.

Asimismo, se observó una mayor variabilidad en los tiempos estimados para el tratamiento SP SC A, que se lleva a cabo sin pasteurizar, sin la adición de cultivo láctico y a temperatura ambiente. Esto también concuerda con lo estudiado, ya que no se tiene control sobre la microbiota presente en la leche, la cual lleva a cabo la fermentación, y cuyo efecto es el más influyente sobre la tasa de fermentación. A diferencia del resto de los tratamientos, que en comparación con el SP SC A, presentan una variabilidad mucho menor.

Al observar los tiempos obtenidos y tomando en cuenta no sólo la evidencia de la presencia de contaminación fecal encontrada en las muestras de los distintos productores de leche agria, sino también el alcance de este estudio y las condiciones bajo las cuales fue realizado, es necesario recomendar la pasteurización, el uso de un cultivo láctico, la medición del pH final (que debe ser al menos de 4,4) y el reforzamiento en el grado de aplicación de las BPM para prevenir una contaminación del producto final.

Las consecuencias de estos cambios permitirían una mejora en la garantía de la inocuidad del producto final, así como un aumento importante en la productividad al disminuir el tiempo de elaboración, que a su vez le permite a los productores recibir un mayor número de pedidos, llevar a cabo una entrega más rápida, elaborar una mayor cantidad del producto y planificar de mejor manera la producción. Estos cambios impactarían positivamente la situación económica de los productores artesanales de leche agria en Costa Rica.

5.3. Transferencia de los resultados obtenidos a los productores de leche agria

El taller de capacitación propuesto (ver apartado 5.4.3.) fue recibido por 13 personas en total, todas asociadas a las lecherías que participaron del proceso (ver anexo 10.7. Imágenes tomadas durante los talleres de capacitación). Sin embargo, debido a la disponibilidad de tiempo, la ubicación y a la realidad de transporte, que era muy variable, no hubo posibilidad de unir a los diferentes participantes en una sola aplicación, por lo tanto, el taller se aplicó a cada uno de los productores por separado. Este fue un aspecto importante, ya que se tuvo que ser flexible y adaptar la capacitación a diferentes espacios y realidades. Los productores D y E fueron los únicos en los que participó una sola persona en el taller, en ambos casos, el dueño de la empresa y a su vez encargado de la producción. En el caso de A, B y C, hubo al menos una persona más, las cuales son responsables o participaban en el proceso de producción de la leche agria.

El grado de escolaridad de los participantes influyó en la forma de aplicación del taller y en su duración, ya que dos no completaron la educación primaria, una persona completó hasta la educación primaria, dos personas completaron hasta tercer año de secundaria, seis de ellos completaron hasta el quinto año de secundaria, una se encuentra terminando sus estudios universitarios y solamente una tiene completa su educación universitaria, de esta manera algunos de los participantes tenían la capacidad de leer y entender de forma más expedita las evaluaciones y otros necesitaron ayuda con la lectura y comprensión de las mismas.

De igual forma, durante la explicación de los términos importantes, la discusión del informe realizado para cada empresa y la lectura y discusión de la guía de proceso (ver anexo 10.6 “Guía de proceso para el aseguramiento de la inocuidad y estabilidad de la leche agria”), se adaptó la duración, los términos utilizados y el tiempo para discusión y preguntas según la necesidad de los participantes.

A continuación, en el Cuadro XIV se presentan los resultados de la prueba de hipótesis realizada para el análisis de las evaluaciones aplicadas a los participantes del taller de capacitación, con el objetivo de evaluar el grado de aprendizaje obtenido.

Cuadro XIV. Resultados del análisis de las evaluaciones aplicadas a los participantes del taller de capacitación.

Diferencia entre el promedio de aciertos después y antes del taller	Valor p asociado
1,4615	0,0013*

*Valor p < 0,05 indica que existe diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%.

Fuente: elaboración propia.

Se observa la diferencia entre los valores promedios de respuestas correctas, antes y después de la aplicación del taller, y el valor p asociado a dicha diferencia según la hipótesis planteada. Dado que el valor de p obtenido es < 0,05 se rechaza la hipótesis nula planteada y se concluye con un 95% de confianza, que luego del taller hubo un aumento significativo en el número de respuestas correctas por parte de los participantes.

Durante el desarrollo del taller a través de las preguntas, dudas y cuestionamientos que surgieron se puede afirmar que hubo un interés genuino así como aceptación y apertura por parte de todos los participantes, a la información planteada y a los cambios propuestos, haciendo que esta experiencia fuera de mayor provecho.

En la Figura 5 se pueden observar las distribuciones porcentuales de las calificaciones dadas por los participantes, al taller de capacitación, en la evaluación de satisfacción. Las distribuciones fueron categorizadas como: a. Sobre la actividad en general, b. Sobre el expositor, c. Metodología y recursos, d. Material didáctico impreso y e. Coordinación.

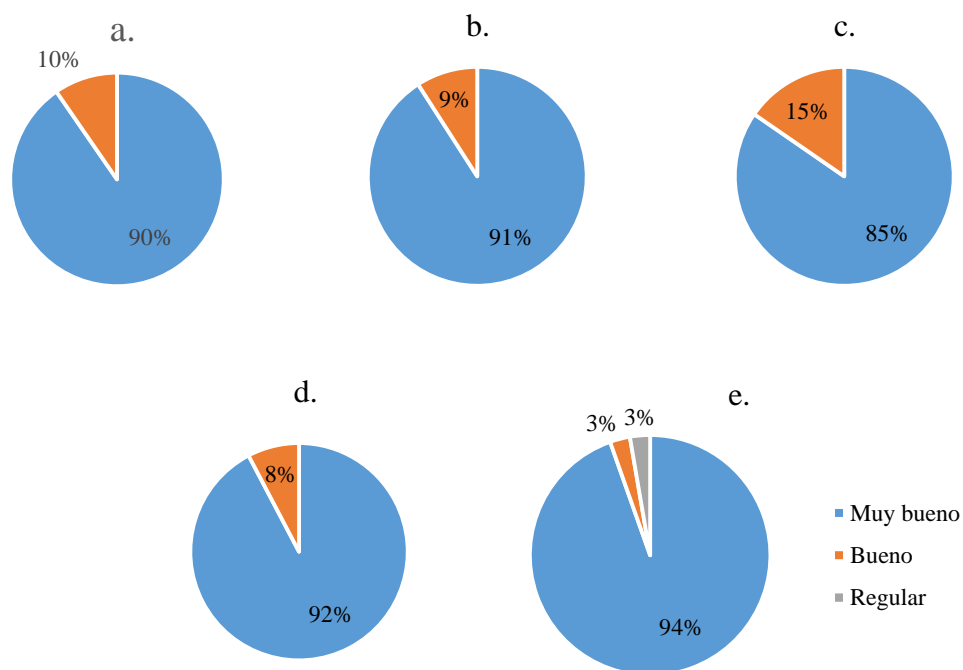


Figura 5. Resultados de la evaluación de satisfacción aplicada a los productores que participaron en el taller capacitación. (a. Sobre la actividad en general, b. Sobre el expositor, c. Metodología y recursos, d. Material didáctico impreso y e. Coordinación)

En general, los participantes expresaron su satisfacción con el taller recibido, la información y la forma en que se llevó a cabo. Esto se ve reflejado en la Figura 5, ya que en su mayoría, el taller de capacitación fue evaluado como “Muy bueno” y “Bueno”.

En la categoría a. se evaluó el grado de cumplimiento de los objetivos y de las actividades, así como el contenido teórico y práctico del taller. El 90% de los participantes evaluó el taller, en este aspecto, como “Muy bueno” y en su mayoría no expresaron ninguna sugerencia u oportunidad de mejora, sin embargo, uno de los participantes sugirió incluir ejemplos prácticos para explicar algunas definiciones, especialmente para promover el aprendizaje de las personas con menor grado de escolaridad.

En la categoría b. se evaluó al expositor, su dominio de la materia, su capacidad de despertar interés, su capacidad para dirigir al grupo, su claridad al exponer, su disposición para responder preguntas y su puntualidad. El 91% de los participantes calificó esta categoría como “Muy bueno”. No obstante, algunos de los participantes de la primera aplicación del taller, expresaron que el

expositor hablaba muy rápido en algunos momentos durante la exposición de los conceptos. En las evaluaciones obtenidas de los talleres posteriores no se recibió tal comentario.

En cuanto a la categoría c., se evaluó el método de enseñanza, el apoyo audiovisual y la evaluación aplicada. En este caso, un 85% de las calificaciones otorgadas fue de “Muy bueno”, y no hubo comentarios al respecto por parte de los participantes.

En la categoría d. se evaluó el material didáctico impreso, su calidad, el contenido y su diseño, y por último en la categoría e. se evaluó la coordinación y organización del taller y el suministro de materiales. En ambas categorías se obtuvo un mayor porcentaje en la calificación de “Muy bueno”, un 92% y un 94% respectivamente.

6. Conclusiones

- La aplicación de las BPM de productores artesanales en Costa Rica, considerando la muestra evaluada, es deficiente y en algunos casos, inexistente, aun así cuentan con los permisos necesarios para la producción y venta de productos lácteos.
- El perfil microbiológico de la leche agria analizada en Costa Rica, concuerda en su mayoría con lo encontrado y reportado en otros países a nivel mundial en cuanto a los valores de recuento total aerobios mesófilos, recuento de mohos y levaduras y el recuento de bacterias lácticas.
- Considerando como referencia las muestras analizadas en este estudio, *E. coli* genérica está presente en muestras de leche agria producida en Costa Rica en cantidades que sobrepasan el límite máximo permitido para productos lácteos fermentados, esto hace posible la presencia de *E. coli* enterotoxigénica u otros patógenos entéricos y el riesgo de que dicho producto cause un brote de infección gastrointestinal, por lo que resulta imperativo establecer medidas que permitan garantizar la ausencia de este microorganismo.
- El presente estudio no demostró que se pueda prescindir de la pasteurización o la aplicación de las BPM para asegurar la inocuidad de la leche agria, por lo tanto, su aplicación debe mantenerse durante todo el proceso de elaboración.
- La producción de leche agria a partir de leche pasteurizada y con adición de cultivo mejora el proceso de elaboración, permitiendo que sea más estable y que esté lista en menor tiempo.
- Los participantes del taller mejoraron su conocimiento acerca de los conceptos importantes y el proceso de elaboración de leche agria para la obtención de un producto inocuo.

7. Recomendaciones

- Implementar la pasteurización de la leche y la medición y monitoreo del pH final del producto, como medidas de control indispensables en el proceso de elaboración de leche agria para garantizar la inocuidad del producto terminado.
- Utilizar envases plásticos nuevos como empaque para el producto, ya sea antes o después de la fermentación.
- Promover este tipo de trabajos de investigación, de tal manera que se pueda llegar a los productores con información y capacitación en temas que les permitan mejorar sus prácticas actuales para el aseguramiento de la inocuidad de sus productos.
- Establecer mecanismos de acompañamiento y seguimiento para los productores con el fin de que el conocimiento adquirido (en talleres, cursos, asesorías, entre otros.) pueda ser aplicado de manera efectiva en sus empresas tomando en cuenta sus condiciones.
- Determinar y establecer los procedimientos necesarios para prevenir la contaminación cruzada de la leche en las operaciones que se realizan después de la pasteurización.
- Evaluar la aceptación de la leche agria producida a partir de leche pasteurizada y con adición de cultivo, por parte de consumidores habituales de leche agria.

8. Bibliografía

- ADAMS, M. 2009. *Staphylococcus aureus* and other pathogenic Gram-positive cocci. Foodborne Pathogens, Hazards, Risk Analysis and Control. 2nd edition. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, UK.
- ALFARO, L. 2016. Visita a la planta de producción “ASOMUPRA”. Agroindustrial, Golfito, Costa Rica. Comunicación personal.
- ÁLVAREZ, R. 2016. Visita a la planta de producción “Lácteos Santiesteban”. Santa Cruz, Turrialba, Costa Rica. Comunicación personal.
- AOAC. s.f. Official Methods of Analysis. AOAC International. INTERNET. <http://www.eoma.aoc.org>
- AURELI, P.; FRANCIOSA, G. & SCHECHTER, R. 2003. International Handbook of Foodborne Pathogens: *Clostridium botulinum*. CRC Press.
- AXELSSON, D.; SVENSSON, L.; OLOFSSON, J.; SALOMON, P.; WALDENSTROM, J.; ELLSTROM, P. & OLSEN, B. 2017. Increased in Acid Tolerance of *Campylobacter jejuni* through Coincubation with Amoebae. American Society For Microbiology.
- BAM. 2001. Chapter 3. Aerobic Plate Count. INTERNET. <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm063346.htm>
- BAM. 2002. Chapter 4. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. INTERNET. <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm064948.htm>
- BATT, C. 2016. Food safety, Defense and Microbiology. Reference Module in Food Science. Cornell University, Ithaca, NY, USA.
- BÉAL, C & HELINCK, S. 2015. Yogurt and other fermented milks. Microorganisms and Fermentation of Traditional Foods. CRC Press, Boca Ratón.
- BÉAL, C.; SKOKANOVA, J.; LATRILLE, E.; MARTIN, N. & CORRIEU, G. 1999. Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yoghurt. *Journal of Dairy Science* 82(4): 673–681.
- BELL, C. & KYRIAKIDES, A. 2009. Salmonella. Foodborne Pathogens, Hazards, Risk Analysis and Control. 2nd edition. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, UK.
- BUCHIESER, C. & ROCOURT, J. 2007. *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. 3 ed. CRC Press.

- CANADIAN DAIRY COMMISSION. 2011. Fermented Milk Products. INTERNET. <http://www.milkingredients.ca/index-eng.php?id=180>
- CANDELO, C.; ORTIZ, G. & UNGER, B. 2003. Hacer talleres: Una guía práctica para capacitadores. WWF Colombia, Cali, Colombia.
- CDC. 2011. *Staphylococcus aureus* in Healthcare Settings. INTERNET. <https://www.cdc.gov/hai/organisms/staph.html>
- CDC. 2016. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2014, Annual Report. US Department of Health and Human Services, CDC. Atlanta, Georgia.
- CHACÓN, M. 2018. Conversación con la Lic. Margarita Chacón de la empresa Dos Pinos. San José, Costa Rica. Comunicación personal.
- CHENG, H. 2010. Volatile flavor compounds in yogurt: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50(10): 938–950.
- CITA. 2016a. Determinación del pH. P-SA-MQ-012. Emisión No 7. San José, Costa Rica.
- CITA. 2016b. Recuento de Aerobios Mesófilos. P-SA-MQ-001. Emisión No 2. San José, Costa Rica.
- CITA. 2016c. Recuento de Mohos y Levaduras. P-SA-MQ-007. Emisión No 3. San José, Costa Rica.
- CITA. 2016d. Recuento de bacterias ácido lácticas. P-SA-MQ-006. Emisión No 1. San José, Costa Rica.
- CITA. 2016e. NMP de *Escherichia coli*. P-SA-MQ-004. Emisión No 2. San José, Costa Rica.
- CITA. 2016f. Evaluación de cursos. R-CA-006. Emisión No. 6. San José, Costa Rica.
- COURTIN, P. & F, RUL. 2004. Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Lait* 84: 125–134.
- DORMER, B.; MARTINAGLIA, G. & BEEMER, A. 1953. Observations on the longevity of human and bovine tubercle bacilli in calabash milk. *South African Medical Journal* 27(50):1121
- FAO. 2016a. Producción y productos lácteos: Peligros para la salud. INTERNET. <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/leche-y-productos-lacteos/peligros-para-la-salud/es/#.V-lcEq1ApX9>

- FAO. 2016b. Producción y productos lácteos: Calidad y evaluación. INTERNET. <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/leche-y-productos-lacteos/calidad-y-evaluacion/es/#.V-lc4K1ApX8>
- FDA. 2012. Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. 2nd edition. INTERNET. <https://www.fda.gov/downloads/food/foodborneillnesscontaminants/ucm297627.pdf>
- FDA. 2015. Grade “A” Pasteurized Milk Ordinance. U.S. Department of Health and Human Services. USA. INTERNET. <https://www.fda.gov/downloads/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/milk/ucm513508.pdf>
- FDA. 2017. Food Code. U.S. Department of Health and Human Services. USA. INTERNET. <https://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/FoodCode/UCM595140.pdf>
- FELLOWS, P. 2017. Pasteurisation. Food Processing Technology. 4th edition. Woodhead Publishing
- FLORENCE, A.; BÉAL, C.; SILVA, R.; BOGSAN, C.; PILLEGGIA, A.; GIOIELLIA, L. & OLIVEIRA, M. 2012. Fatty acid profile, trans-octadecenoic, α -linolenic and conjugated linoleic acid contents differing in certified organic and conventional probiotic fermented milks. Food Chemistry 135(4): 2207–2214.
- FLORENCE, A.; DA SILVA, R.; SANTO, A.; GIOIELLI, L.; TAMIME, A. & OLIVEIRA, M. 2009. Increased CLA content in organic milk fermented by bifidobacteria or yogurt cultures. Dairy Science and Technology 89(6): 541–553.
- GIBBS, P. 2009. Pathogenic *Clostridium* species. Foodborne Pathogens. 2nd edition. Woodhead Publishing, Portugal.
- GARNEAU, J. & MOINEAU, S. 2011. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. Microbial Cell Factories 10(Suppl 1): S20.
- GRAN, H.; WETLESEN, A.; MUTUKUMIRA, A. & NARVHUS, J. 2002. Smallholder dairy processing in Zimbabwe: The production of fermented milk products with particular emphasis on sanitation and microbiological quality. Food Control, 13(3), 161–168.
- GRAN, H.; WETLESEN, A.; MUTUKUMIRA, A.; RUKURE, G. & NARVHUS, J. 2003. Occurrence of pathogenic bacteria in raw milk, cultured pasteurised milk and naturally soured milk produced at small-scale dairies in Zimbabwe. Food Control, 14, 539-544.

- HAARMANN, N.; BERGER, M.; KOUZEL, I.; MELLMANN, A. & BERGER, P. 2018. Comparative characterization of Shiga toxin phage-cured *Escherichia coli* O104:H4 and enteroaggregative *Escherichia coli*. International Journal of Medical Microbiology, Münster, Germany.
- HIDALGO, C.; MONGE, A.; MOLINA, J.; CAMACHO, J.; VARGAS, G. & BARRIENTOS, O. 2004. Informe parcial del país sobre la situación nacional de los recursos zoo genéticos. Subcomisión Nacional encargada de la elaboración del Informe País sobre la situación de los recursos genéticos pecuarios de Costa Rica. 43 p.
- HUNDY, G.; TROTT, A. & WELCH, T. 2016. Food Refrigeration and Freezing. Refrigeration, Air Conditioning and Heat Pumps. 5th edition. Elsevier.
- JARVIS, B. 2014. Good Manufacturing Practice. Encyclopedia of Food Microbiology. 2nd edition. Elsevier, UK.
- KOUTINAS, A. 2017. Fermented Dairy Products. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Food and Beverages Industry. Elsevier, Patras, Greece.
- KRISTO, E.; BILIADERIS, C. & TZANETAKIS, N. 2003. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. International Dairy Journal, 13, 517-528.
- KUMAR, A; SANJEEV, K; PUNIYA, M & MALIK, R. 2015. Fermented Milk and Dairy Products: An Overview. CRC Press, Boca Ratón.
- LITOPOULOU-TZANETAKI, E. & TZANETAKI, N. 2014. Fermented Milks: Range of Products. Encyclopedia of Food Microbiology. 2nd edition. Reference Module in Food Science. Elsevier, Thessaloniki, Greece.
- MADRIZ, J. 2017. Sector lácteo costarricense en el marco de la apertura comercial. XXIII Congreso Nacional Lechero. Cámara Nacional de Productores de Leche, Costa Rica.
- MAHONY, J., AINSWORTH, S., STOCKDALE, S & VAN SINDEREN, D. 2012. Phages of lactic acid bacteria: the role of genetics in understanding phage-host interactions and their co-evolutionary processes. Virology 434: 143–150.
- MATTICK, A. & HIRSCH, A. 1946. Sour milk and the tubercule bacillus. Lancet 1:417.
- MAYO, B.; SALIM, M.; DELGADO, S. & ALEGRÍA, A. 2010. Fermented Milk Products. Fermented Foods and Beverages of the World. CRC Press

- MICHEL, A.; GEOGHEGAN, C.; HLOKWE, T.; RASELEKA, K.; GETZ, W. & MARCOTTY, T. 2015. Longevity of *Mycobacterium bovis* in raw and traditional souring milk as a function of storage temperature and dose. PLOS ONE 10(6): e0129926
- MOATSOU, G. MOSCHOPOULOU, E. 2015. Microbiology of Raw Milk. Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Developments. CRC Press.
- MUTUKUMIRA, A. 1995. Properties of amasi, a natural fermented milk produced by smallholder milk producers in Zimbabwe. Milchwissenschaft—Milk Science International, 50(4), 201–205.
- NAGHILI, H.; TAJIK, H.; MARDANI, K.; RAZAVI, S.; EHSANI, A. & ZARE, P. 2013. Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. Veterinary Research Forum 4 (3): 179-183.
- NARVHUS, J. & GADAGA, T. 2003. The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review. International Journal of Food Microbiology 86: 51–60
- DE OLIVEIRA, A.; DA CRUZ, A.; TAVOLARO, P. & CORASSIN, C. 2016. Food Safety: Good Manufacturing Practices (GMP), Sanitation Standard Operating Procedures (SSOP), Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP). Antimicrobial Food Packaging. Academic Press, Sao Paulo, Brazil.
- OMS. 2017. Nota descriptiva: Inocuidad de los alimentos. Centro de prensa. INTERNET. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- OMS. 2018a. Nota descriptiva: *E. coli*. Centro de prensa. INTERNET. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- OMS. 2018b. Nota descriptiva: Botulismo. Centro de prensa. INTERNET. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/botulism>
- OMS. 2018c. Nota descriptiva: *Campylobacter*. Centro de prensa. INTERNET. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>
- OSTLIE, H.; TREIMO, J. & NARVHUS, J. 2005. Effect of temperature on growth and metabolism of probiotic bacteria in milk. International Dairy Journal 15: 989–997.
- POUCH, F. & IT, K. 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. 4th edition. Washington, DC, USA.

- PULGAR, J. 2005. Evaluación del aprendizaje en educación no formal. Recursos prácticos para el profesorado. Narcea S.A., España.
- RAMESH, M. 2003. Sterilization of Foods. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. 2nd edition. Academic Press, Mysore, India.
- ROUTRAY, W. & H.N. MISHRA. 2011. Scientific and technical aspects of yogurt aroma and taste: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10(4): 195–247.
- RTCA. 2007. RTCA 67.01.33:06. Industria de alimentos y bebidas procesados. Buenas prácticas de Manufactura. Principios generales. INTERNET. <https://cgrfiles.cgr.go.cr/publico/jaguar/.../Decretos/DE-33724.doc>
- RTCA. 2009. RTCA 67.04.50:08. Alimentos. Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de Alimentos. INTERNET. <http://www.mspas.gob.gt/images/files/drca/normativasvigentes/RTCACriteriosMicrobiologicos.PDF>
- RTCR. 2006. RTCR 401-2006. Leche cruda y Leche Higienizada. La Gaceta, Costa Rica. INTERNET.
- SENAN, S. & PRAJAPATI, J. 2015. Fermented Milk and Dairy Products: Acidophilus Milks. CRC Press.
- SMIT, G., SMIT, B. & ENGELS, E. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews* 29:591–610.
- SOLANO, M. 2016. Visita a la planta de producción “Las Abras”. Turrialba, Costa Rica. Comunicación personal.
- TAMANG, J.; WATANABE, K. & HOLZAPFEL, W. 2016. Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7
- TEUSINK, B. & MOLENAAR, D. 2017. Systems biology of lactic acid bacteria: For food and thought. *Current Opinion in Systems Biology* 6: 7-13
- TORRES, R. 2016. Productores de leche agria en la zona de Turrialba. ASOPROA, Turrialba, Costa Rica. Comunicación personal.
- VILABOIA, J.; DÍAZ, P.; WINGCHING, R. & QUIRÓS, O. 2011. Características DE la industria lechera en Costa Rica. *Industria Lechera en Costa Rica*. INTERNET.

<https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/industria-lechera-en-costa-rica-t28822.htm>

VÍQUEZ, D. 2012. Caracterización de la producción artesanal de queso en las empresas de la Cámara Nacional de Queseros Artesanos y Afines (CANAQUEAF), capacitación de sus miembros y elaboración de una propuesta de plan de acción que permita revalorizar los quesos artesanales. Práctica Dirigida. Escuela de Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Agroalimentarias. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

VIRGINIA COOPERATIVE EXTENSION. 2011. How do you know if your food is safe to sell. INTERNET. https://pubs.ext.vt.edu/FST/FST-9/Food_Safety_PDF.pdf

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. & GEURTS, T. 2005. Dairy Science and Technology: Fermented Milks. 2nd edition. CRC Press.

YOUSSEEF, M.; LAFARGE, C.; VALENTIN, D.; LUBBERS, S. & HUSSON, F. 2016. Fermentation of cow milk and/or pea milk mixtures by different starter cultures: physico-chemical and sensorial properties. LWT-Food Science and Technology, 69, 430-437.

9. Anexos

9.1. Perfil microbiológico de distintas leches fermentadas de África

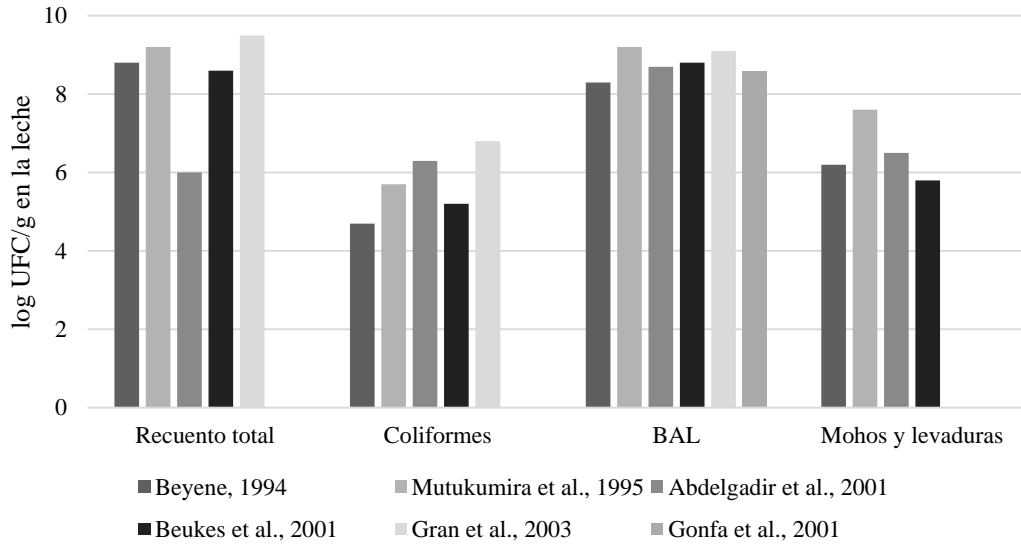


Figura 6. Perfil microbiológico de distintas leches fermentadas de África (Narvhus & Gadaga, 2003).

9.2. Herramienta para el diagnóstico de los productores de leche agría

GUÍA PARA LA VISITA A PRODUCTORES DE LECHE AGRÍA

Fecha de la visita: _____

1. Información básica y características de la empresa y del productor

Nombre de la empresa: _____

Dirección de la empresa: _____

Nombre del propietario: _____

Teléfono: _____ (trabajo); _____ (personal); _____ (otro)

Correo electrónico: _____

Responsable de la producción: _____

Número de empleados: _____

Productos que produce: _____

2. **Producción**

2.1. Materia prima:

- Producción propia () Sí () No Tipo de ordeño: _____
 - Tipo de leche: _____ Raza: _____
 - Control veterinario () Sí () No ¿Quién lo realiza? _____
- Frecuencia: _____ Consta de: ___ Brucelosis; ___ Tuberculosis;
 ___ Leptospirosis; ___ Otros
- ¿Qué desparasitantes utilizan? _____
 - Control lechero () Sí () No ¿Quién lo realiza? _____
- Frecuencia: _____ Registro () Sí () No
- ¿La leche se almacena en tanques fríos? () Sí () No
- Control de temperatura () Sí () No Registro () Sí () No
- ¿Se realizan controles microbiológicos aparte del control lechero? () Sí () No
- ¿Cuáles? _____
- ¿Quién lo lleva a cabo? _____
- Frecuencia: _____
- ¿Se realizan controles fisicoquímicos aparte del control lechero? () Sí () No
- ¿Cuáles? _____
- ¿Quién lo lleva a cabo? _____
- Frecuencia: _____
- Recepción de la leche: ¿Reciben leche de terceros? () Sí () No Cantidad: _____
- Temperatura de la leche en la recepción: _____ °C
- ¿Qué controles realizan? _____
- _____
- Frecuencia: _____
- Observaciones

Control	Sí/No	Resultado
Litraje		
Células somáticas		
Recuento Total (UFC/L)		
Antibióticos		
Punto crioscópico		
Metales pesados		
Mastitis		
Coliformes totales		
<i>Salmonella spp</i>		
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Listeria monocytogenes</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		
Coliformes fecales		
Materia grasa		
Proteína		
Acidez-pH		

Densidad		
Punto de congelación		

2.2. Proceso de elaboración:

- Flujo de proceso:

Etapa	Descripción

- ¿Qué controles tienen durante el proceso?

___ pH ___ Temperatura ___ Tiempo

___ Físicos ¿Cuáles? _____

___ Sensoriales ¿Cuáles? _____

___ Otros: _____

- ¿Cómo se miden estos controles?

pH: _____ Temperatura: _____ °C Tiempo: _____

Físicos: _____

Sensoriales: _____

Otros: _____

- Condiciones ideales

pH: _____ Temperatura: _____ °C Tiempo: _____ (min/hora/día)

Físicos: _____

Sensoriales: _____

Otros: _____

2.3. Producto terminado:

Nombre del producto	
Descripción	
Empaque	
Indicaciones en etiqueta	
Condiciones de almacenamiento y vida útil	
Tipo de consumidor	
Forma de consumo	

- ¿Realizan controles sobre el producto terminado? () Sí () No

¿Cuáles? _____

Frecuencia: _____ Responsable: _____

3. Inspección diagnóstico de Buenas Prácticas de Manufactura

Requisitos	Inspección		Observaciones
	Cumple	No cumple	
1. EDIFICIO			
1.1. ALREDEDORES Y UBICACIÓN			
1.1.1. Alrededores			
Almacenamiento adecuado del equipo en desuso			
Libre de basura y desperdicios			
Áreas verdes limpias			
Patios y lugares de estacionamiento limpios			
Inexistencia de lugares atractivos o de refugio para insectos y roedores			
Mantenimiento adecuado de los drenajes			

Operación adecuada de los sistemas para el tratamiento de desperdicios			
1.1.2. Ubicación			
No expuesta a contaminación física, química o biológica			
Separadas de cualquier ambiente utilizado como vivienda			
Desecho de sólidos y líquidos de manera eficaz			
Vías de acceso y patios de maniobra pavimentados			
1.2. INSTALACIONES FÍSICAS			
1.2.1. Diseño			
Fácil mantenimiento, limpieza y desinfección			
Impedir el ingreso de animales e insectos			
Reducir ingreso de contaminantes (humo, vapor, etc.)			
Vestidores			
Comedor			
Bodegas (separadas MP, PT, LyD, sustancias peligrosas)			
Área de trabajo de espacio suficiente (equipo a 50 cm de la pared, limpieza, movimiento, etc.)			
Material adecuado			
Construcción sólida y en buen estado			
1.2.2. Pisos			
Impermeable			
Fácil LyD			
Liso			
Uniones redondeadas			
Fácil drenaje			
1.2.3. Paredes			
Impermeable			
Fácil LyD			
Liso			
Uniones redondeadas			
Revestimiento claro			
1.2.4. Techos			
Sin suciedad			
Sin condensación o humedad			
Liso			
Sin uniones			
Fácil limpieza			
1.2.5. Puertas y ventanas			
a) Ventanas	Fácil limpieza		
	Cerradas y protegidas		
	Evitan suciedad		

	Impiden su uso para almacenar objetos			
a) Puertas	Liso			
	Fácil LyD			
	Buen estado			
1.2.6. Iluminación				
	Luz natural			
	Artificial de color adecuado			
	Buen estado			
	Instalación eléctrica y lámparas recubiertas			
1.2.7. Ventilación				
	Circulación adecuada del aire			
	Sistema de extracción			
	Flujo adecuado del aire			
	Protegida			
1.3. INSTALACIONES SANITARIAS				
1.3.1. Abastecimiento de agua				
	Es suficiente			
	Potable			
	Registros de cloro residual u otros			
	Evaluación periódica (análisis físico-químicos, bacteriológicos y los registros)			
	Sistema identificado (potable/no potable)			
	Flujo evita contaminación cruzada			
1.3.2. Tuberías				
	Suficiente capacidad para toda la planta			
	Transporte adecuado de aguas negras y servidas			
	Drenaje adecuado			
	Sistema evita retroflujo o contaminación cruzada			
1.3.3. Baños				
	Separados por sexo			
	Limpios			
	Buen estado			
	Ventilación hacia el exterior			
	Aparte del área de proceso			
	Jabón			
	Papel higiénico			
	Toallas de papel o secador de manos			
	Basureros			
	Inodoros (1/20 hombres o 1/15 mujeres)			
	Lavamanos (1/15 trabajadores)			
1.3.4. Vestidores				
	Aparte de los servicios sanitarios			
	Separados por sexo			
	Casilleros (uno por operario)			
1.3.5. Lavamanos				
	Buen estado			

Acción no manual			
Jabón antibacterial			
Toallas de papel o secador de manos			
Instrucciones de lavado de manos			
1.4. MANEJO Y DISPOSICIÓN DE DESECHOS LÍQUIDOS			
1.4.1. Drenajes			
Evita contaminación			
Protegidos (rejilla)			
1.5. MANEJO Y DISPOSICIÓN DE DESECHOS SÓLIDOS			
Procedimiento y programa escrito			
Desecho alejado del producto y área de trabajo			
Recipientes tapados			
Espacio bajo techo			
Fácil limpieza			
1.6. LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN			
Procedimiento y programa escrito (distribución, responsable, método, frecuencia y monitoreo)			
Productos con registro sanitario			
Instrucciones de uso de los productos			
1.7. CONTROL DE PLAGAS			
Programa escrito			
Identificación de las plagas			
Mapeo de estaciones			
Productos aprobados			
Procedimientos utilizados			
Almacenamiento adecuado de los productos			
Cuenta con barreras físicas			
Monitoreo			
Medidas correctivas			
Registros			
2. EQUIPO Y UTENSILIOS			
Acero inoxidable			
Fácil mantenimiento			
Fácil limpieza y desinfección			
Uso adecuado			
Programa de mantenimiento preventivo			
Registros			
3. PERSONAL			
3.1. Capacitación			
Curso de manipulación de alimentos			
Programa escrito			
Actualizado			
Evaluación			
Registros			
3.2. Prácticas higiénicas			

Lavado de manos antes de ingresar al área de proceso			
Lavado de manos después de manipular alimentos crudos			
Guantes desechables y en buen estado			
Uñas cortas			
Sin joyería			
Cabello y barba cubiertos			
Sin maquillaje			
En el área de trabajo (sin toser, estornudar, fumar, comer, etc.)			
Uniforme y calzado adecuado			
Visitantes de acuerdo a BPM			
3.3. Control de salud			
Registro de salud del personal			
Exámenes médicos del personal (documentados y actualizados cada 6 meses)			
Control de visitantes			
Ausencia de personas enfermas en contacto con el alimentos			
4. PROCESO Y PRODUCCIÓN			
4.1. Materia prima			
Especificaciones del producto			
Vencimiento			
Lote			
Proveedor			
Fecha de entrada			
4.2. Operaciones de manufactura			
Flujo de proceso			
Análisis de peligros			
Control de las operaciones			
Se evita contaminación			
4.3. Envasado			
Almacenamiento adecuado del material			
Uso adecuado del envase			
Inspección antes del uso			
4.4. Documentación y registros			
Procedimiento para el control de documentos y registros			
Período de conservación superior a la vida útil del alimento			
5. ALMACENAMIENTO Y DISTRIBUCIÓN			
Estiba adecuada			
Tarimas en buen estado			
PEPS			
Todo etiquetado y rotulado adecuadamente			
Vehículos autorizados por la autoridad competente			

Vehículos con control de temperatura y humedad adecuado			
Carga y descarga evitando contaminación del producto			

Según RTCA, (2007); RTCR, (2006) & Víquez, (2012)

9.3. Detalles de la ficha técnica del cultivo láctico utilizado para la elaboración de leche agria a nivel de planta piloto

Detalle	Información
Descripción	Este cultivo DVS® de Chr. Hansen contiene cepas mesófilas definidas, para uso continuo de inoculación directa a cuba. El cultivo proporciona una producción rápida de ácido láctico y una alta resistencia frente a fagos, sin producción de CO ₂
Composición	<i>Lactococcus lactis</i> sin biovar. diacetylactis
Uso	El uso del cultivo es principalmente utilizado en la producción de quesos con una textura cerrada, p.e. queso Cheddar, Feta y quesos frescos. El cultivo puede ser utilizado en otros productos lácteos fermentados, solos o en combinación con otros cultivos lácticos
Dosis recomendada	Como regla general, 1000 U de cultivo DVS liofilizado corresponde a 100 L de cultivo activo. Sin embargo, las dosis específicas de uso deben ser determinadas experimentalmente antes de cada nueva aplicación

9.4. Flujo de proceso de producción de leche agria de los distintos productores

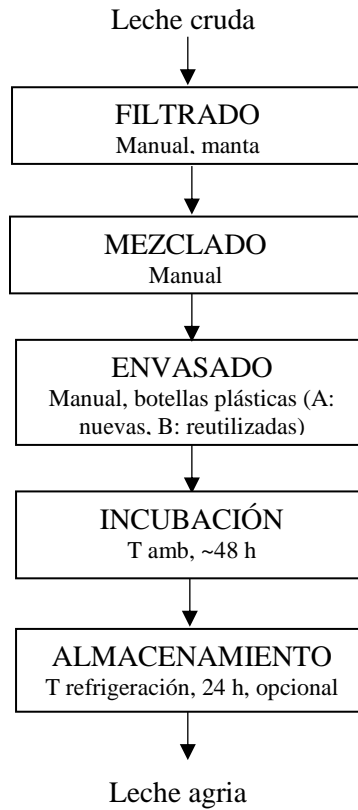


Figura 7. Flujo de proceso para la producción de LFN de la empresa A y B.

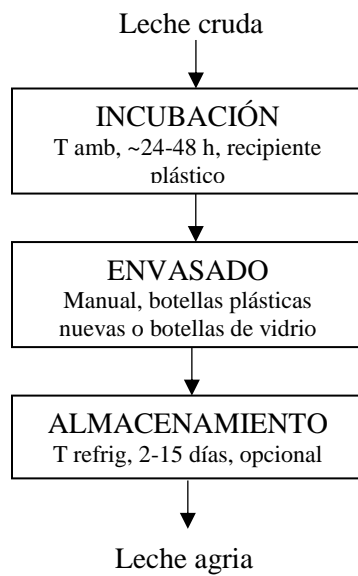


Figura 8. Flujo de proceso para la producción de LFN de la empresa C.

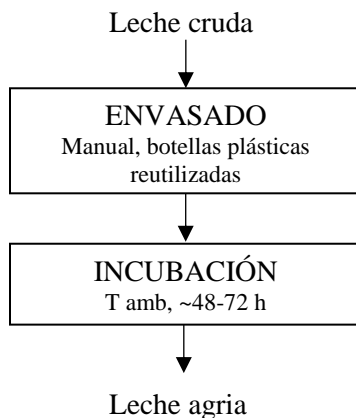


Figura 9. Flujo de proceso para la producción de LFN de la empresa E.

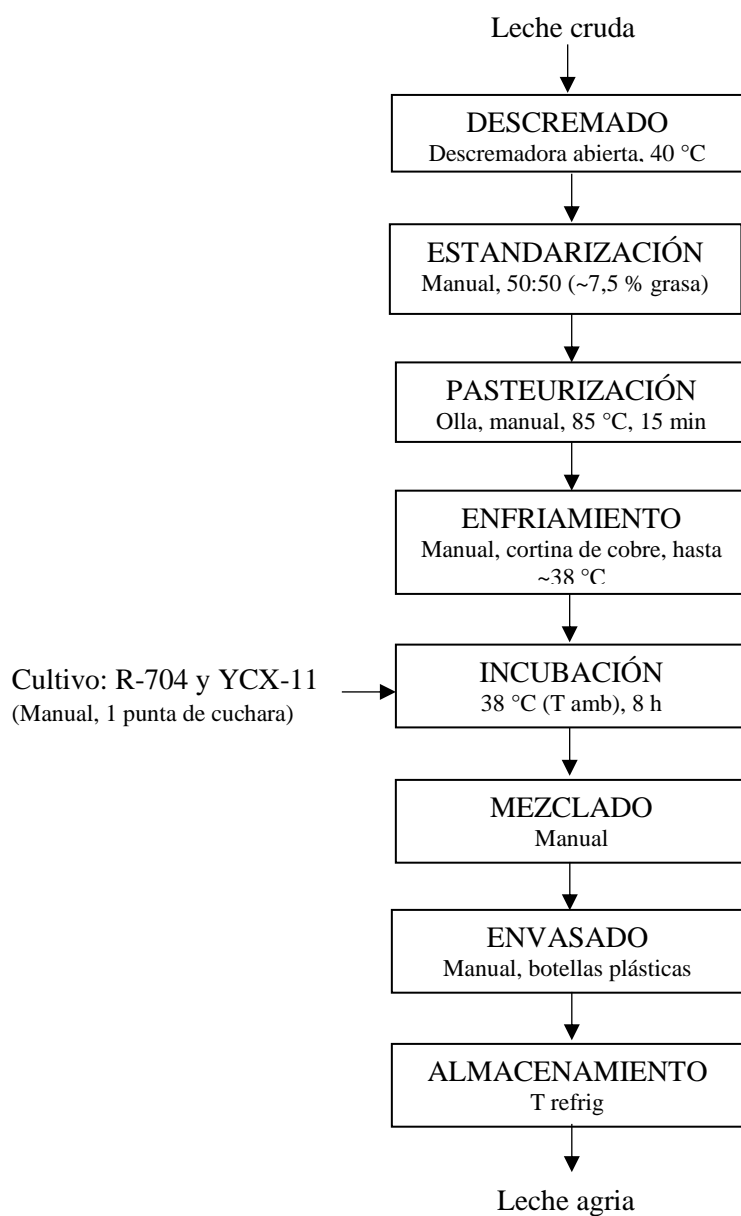


Figura 10. Flujo de proceso para la producción de leche agria de la empresa D.

9.5. Resultados preliminares de las curvas de acidificación

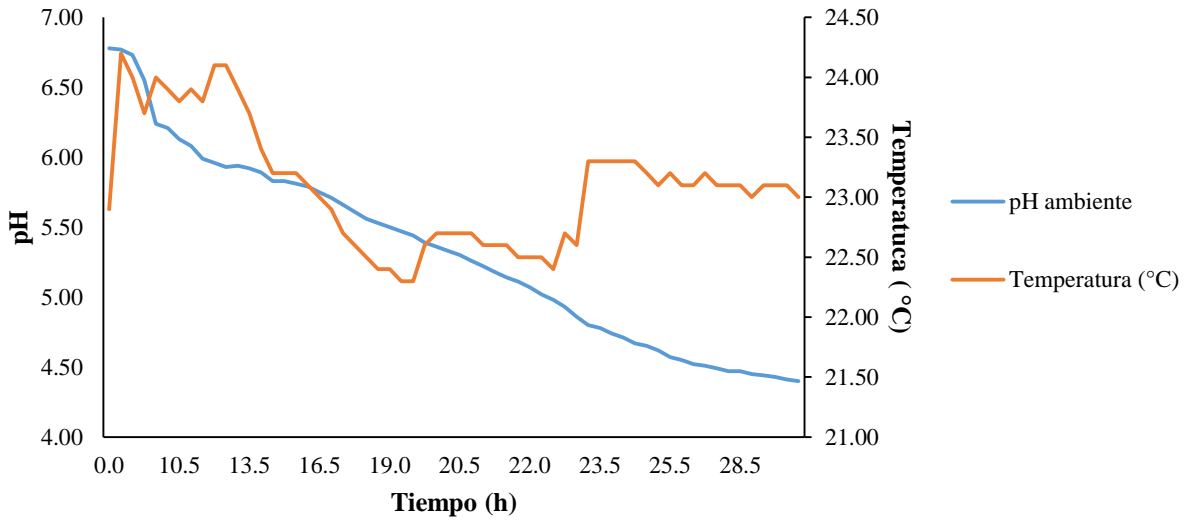


Figura 11. Curva de acidificación de leche agria elaborada a partir de leche cruda e incubada a temperatura ambiente.

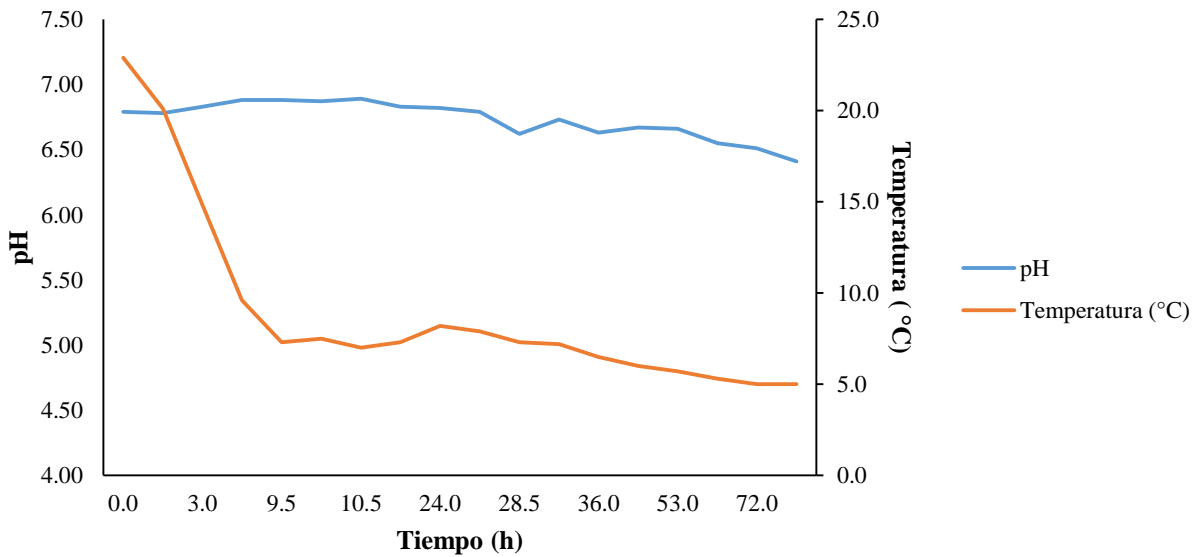


Figura 12. Curva de acidificación de leche agria elaborada a partir de leche cruda e incubada a temperatura de refrigeración.

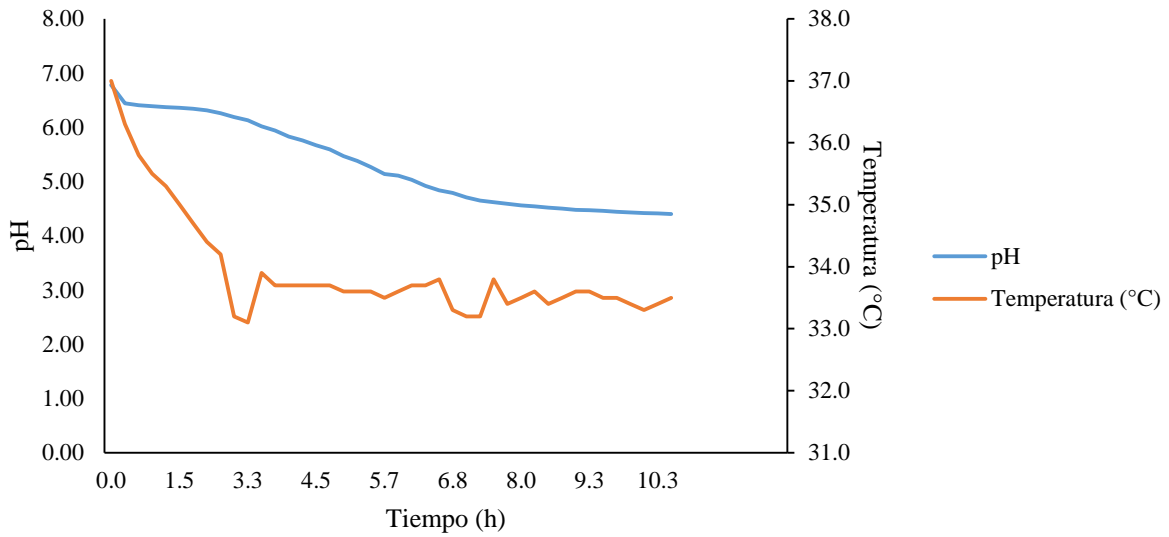


Figura 13. Curva de acidificación de leche agria elaborada a partir de leche pasteurizada e incubada a 37 °C.

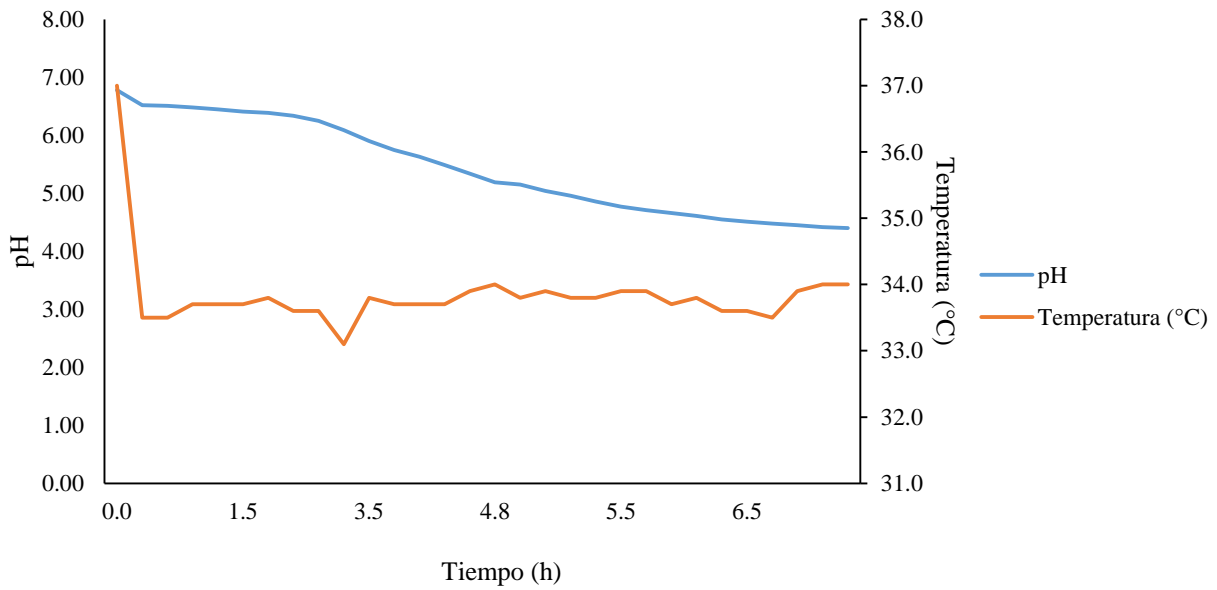


Figura 14. Curva de acidificación de leche agria elaborada a partir de leche cruda e incubada a 37 °C.

9.6. Material utilizado para el taller de capacitación

9.6.1. *Portada*

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Taller de capacitación

Material de apoyo para los productores de leche agria artesanal

Como parte del proyecto de graduación titulado:

Evaluación de las prácticas actuales de formulación, procesamiento, manejo y el efecto de la acidificación sobre la reducción de patógenos y el aseguramiento de la inocuidad de leche agria artesanal producida en Costa Rica

Elaborado por:

Marcela Espinoza Mora

Marzo, 2018

9.6.2. *Objetivos*

- General

Comprender la importancia de la pasteurización, la medición y el monitoreo de parámetros de control y del cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) para el aseguramiento de la inocuidad durante el proceso de elaboración de leche agria.

- Específicos

1. Conocer el efecto de la acidificación sobre distintos patógenos de referencia en productos lácteos fermentados para el establecimiento de parámetros de control que aseguren la inocuidad del producto.
2. Aprender un proceso de elaboración de leche agria que permita la obtención de un producto inocuo.
3. Reconocer oportunidades de mejora en cuanto a la aplicación de las BPM en el proceso de producción, para su posterior aplicación.

9.6.3. Presentación

Inocuidad

“Conjunto de condiciones y medidas necesarias para asegurar que un alimento, al ser ingerido, no represente un riesgo para la salud.”



Bacterias patógenas

○ Microorganismos que pueden causar enfermedades.



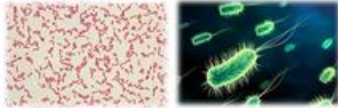
○ Origen: ambiental y seres vivos.

○ Necesidades: alimento, agua, acidez, temperatura, espacio, entre otros.



Bacterias patógenas

Escherichia coli



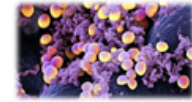
○ Se encuentra en el ambiente, en alimentos y en los intestinos de personas y animales.

○ Hay serotipos patógenos como *E. coli* O157:H7

○ Puede provocar diarrea sanguinolenta e insuficiencia renal.

Bacterias patógenas

Staphylococcus aureus



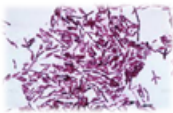
○ Se considera flora normal de los seres humanos, alrededor de un 30% de las personas la tienen dentro de su nariz.

○ Causan infecciones, ya sea por la presencia misma de la bacteria o la producción de toxina.

○ Algunas pueden ser resistentes a cierto tipo de antibióticos.

○ Puede provocar sepsis, cuando las bacterias se diseminan al torrente sanguíneo, neumonía, endocarditis y osteomielitis.

Bacterias patógenas



Clostridium botulinum

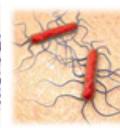
○ Es una bacteria en forma de bastón que vive y crece en condiciones con poco oxígeno.

○ Forma esporas protectoras cuando las condiciones de supervivencia son deficientes.

○ Prevalce en los sedimentos de suelo y marinos, comúnmente como esporas.

○ Causa botulismo, que es una enfermedad potencialmente mortal provocada por la ingestión de una neurotoxina que se produce durante el crecimiento de *C. botulinum*

Bacterias patógenas



Listeria monocytogenes

○ Se encuentra en el ambiente.

○ Ha sido encontrada en productos frescos y de producción casera como quesos, leche sin pasteurizar, helados y pescados, entre otros.

○ Provoca infecciones en el sistema nervioso central, hasta abortos espontáneos, muerte neonatal y meningitis.

○ El riesgo de mortalidad de la bacteria ronda entre el 20% y el 30% de acuerdo con la OMS, y es capaz de generar mayores efectos perjudiciales en mujeres embarazadas, recién nacidos, adultos mayores e individuos con un sistema inmunológico débil.

pH

○ Parámetro que indica la acidez o alcalinidad de una sustancia.



○ En la industria alimentaria permite controlar el crecimiento y proliferación de bacterias patógenas.



Buenas Prácticas de Manufactura



“Disposiciones sobre las prácticas de higiene y operación durante la industrialización de productos alimentarios, con el fin de garantizar su calidad e inocuidad.”

REGLAMENTO TÉCNICO CENTROAMERICANO

RECA 6748.01/06

INSTITUTO DE ALIMENTOS Y BEBIDAS PROCESADOS, BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA PARA PRODUCTOS LÁCTEOS

Leche agria



- Leche fermentada: bacterias lácticas convierten la lactosa en ácido láctico bajo condiciones controladas.
- Se obtiene un producto con sabores, olores y textura diferentes.
- Se aumenta la vida útil del producto, porque hay un descenso de pH y por competencia.

Leche agria: riesgo



○ Se ha encontrado *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* enterotoxigénica en distintas muestras de leche agria pasteurizada y no pasteurizada.

○ Puede sobrevivir y proliferar *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*.

○ Puede ser suficiente para exponer a los seres humanos a la dosis infecciosa necesaria para una infección gastrointestinal.



Evaluación del proceso de elaboración de leche agria

- Condiciones: pasteurización, uso de cultivo láctico y temperatura de incubación.

Tratamiento
Leche sin pasteurizar, sin cultivo, a temperatura ambiente (SP SC A)
Leche sin pasteurizar, con cultivo, a temperatura ambiente (SP CC A)
Leche sin pasteurizar, con cultivo, a 37 °C (SP CC 37)
Leche pasteurizada, con cultivo, a temperatura ambiente (P CC A)
Leche pasteurizada, con cultivo, a 37 °C (P CC 37)



Resultados

Cuadro I. Perfil microbiológico, valores de pH y el intervalo de confianza al 95% de distintas muestras de leche agria producida por los distintos productores artesanales visitados en el presente estudio.

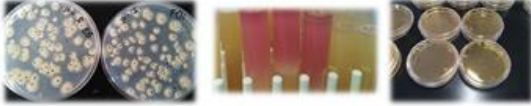
Productor	pH*	RT (Log(UFC/g))*	MyL (Log(UFC/g))*	BAL (Log(UFC/g))*
A	4,5 ± 0,2 ^a	8,9 ± 0,6 ^a	4 ± 1 ^a	8,5 ± 0,9 ^a
B	4,2 ± 0,2 ^a	9,2 ± 0,3 ^a	4,8 ± 0,9 ^a	9,13 ± 0,06 ^a
C	4,5 ± 0,2 ^a	8,6 ± 0,5 ^a	5,3 ± 0,7 ^b	8,4 ± 0,4 ^b
D	4,28 ± 0,05 ^a	8,1 ± 0,6 ^b	5,8 ± 0,5 ^b	8,0 ± 0,6 ^b
E	4,3 ± 0,1 ^a	9,1 ± 0,1 ^a	4,4 ± 0,9 ^b	9,1 ± 0,1 ^b

*Valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes con un $\alpha = 0,05$.

Resultados

Cuadro II. Porcentaje de muestras con presencia de *E. coli* y resultados del diagnóstico de BPM de los distintos productores visitados en el presente estudio.

Productor	% de muestras con <i>E. coli</i>	Nota BPM
A	66,67	46,5
B	100,00	36,0
C	100,00	6,0
D	50,00	42,5
E	100,00	0,0



Resultados

Cuadro III. Tiempo estimado en horas en el que la leche agria, elaborada bajo distintas condiciones (pasteurización, uso de cultivo láctico y temperatura de incubación), alcanza un pH = 4,4.

Tratamiento	Tiempo estimado (h) en que alcanza un pH = 4,4*
Leche sin pasteurizar, sin cultivo, a temperatura ambiente (SP SC A)	55 ± 8 _a
Leche sin pasteurizar, con cultivo, a temperatura ambiente (SP CC A)	17 ± 5 _b
Leche sin pasteurizar, con cultivo, a 37 °C (SP CC 37)	9 ± 2 _b
Leche pasteurizada, con cultivo, a temperatura ambiente (P CC A)	14 ± 2 _b
Leche pasteurizada, con cultivo, a 37 °C (P CC 37)	8 ± 1 _b

*Valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes con un $\alpha = 0,05$.

Resultados

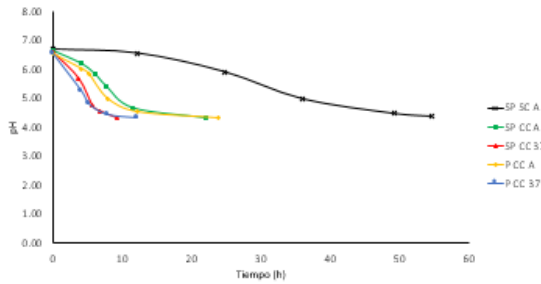


Figura 1. Curva de acidificación del proceso de fermentación para la elaboración de leche agria bajo distintas condiciones

Resultados

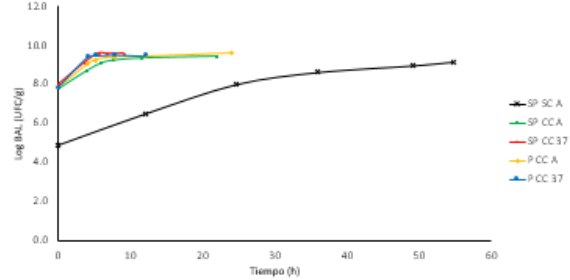


Figura 2. Curva de crecimiento de BAL del proceso de fermentación para la elaboración de leche agria bajo distintas condiciones

9.6.4. Formato de informe de la visita a la empresa

Fecha:	
Empresa:	Fecha de la visita:
Auditor 1:	Lugar:
Alcance:	
Criterio de evaluación: RTCA 67.01.33.06 <i>Industria de alimentos y bebidas procesados. Buenas Prácticas de Manufactura. Principios generales.</i>	
Fortalezas de la empresa en cuanto al cumplimiento legal de los requisitos establecidos en RTCA 67.01.33.06	
Oportunidades de mejora	Criterio del reglamento
Observaciones	
Recomendaciones	

Como parte del proyecto de investigación N° 735-B6- 536 titulado “Validación de las medidas de control para reducir patógenos y garantizar la inocuidad de tres productos lácteos artesanales producidos en la región Mesoamericana” del Centro de Ciencia y Tecnología de Alimentos, se realizó una caracterización química y microbiológica de tres distintos de leche agria procedentes de la empresa _____. De ellos se obtuvo los siguientes resultados:

Cuadro #. Perfil microbiológico y valores de pH de las diferentes muestras de leche agria de la empresa_____.

Parámetro	Leche			
Recuento total (UFC/mL)				
Recuento de mohos y levaduras (UFC/mL)				
Recuento de bacterias lácticas (UFC/mL)				
<i>E. coli</i> (NMP/mL)				
pH				

- Breve explicación de los resultados del perfil microbiológico y las recomendaciones.

9.6.5. Guía de proceso para la elaboración de leche agria

Este documento resume las condiciones de formulación y proceso que aseguran la inocuidad y estabilidad microbiológica de la leche agria. El cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura y el control de la calidad de las materias primas y materiales de empaque es un prerrequisito responsabilidad de la empresa.

Producto	Presentaciones	pH	Clasificación
Leche agria	Botellas de plástico grado alimentario de tamaño variable	4,40-4,20	Producto lácteo fermentado y refrigerado

Formulación

Ingrediente	Cantidad (%)
Leche entera	100
Cultivo láctico mesófilo homofermentativo	*

*Seguir recomendaciones del proveedor

Nota: Los ingredientes deben quedar explícitos en la etiqueta del producto en este mismo orden (orden descendiente dependiendo de su aporte a la formulación). Además, se debe indicar en la etiqueta el tratamiento que se da a la leche por ejemplo pasteurización.

Factores críticos (se deben mantener registros de estos parámetros)

Temperatura de pasteurización de la leche (°C)	≥ 65	Tiempo de pasteurización de la leche (min)	≥ 30	Temperatura máxima de almacenamiento de la leche agria (°C)	≤ 5	pH máximo	$\leq 4,40$
--	-----------	--	-----------	---	----------	-----------	-------------

Nota: El cumplimiento de Buenas Prácticas de Manufactura es esencial para asegurar la inocuidad del producto.

Procedimiento

1. Recibir la leche y realizar las siguientes mediciones:
 - a) Temperatura: debe ser igual o menor a 5°C.
 - b) pH: 6,5-6,8

- c) Grasa: 3,0-5,5%
- d) Sólidos no grasos: 8,0-10,0%
- e) Proteína: 3,0-4,4%
- f) Densidad: min 1,032 g/cm³ a 15°C
- g) Punto crioscópico: -0,513 a -0,531°C
- h) Agua añadida: 0%
- i) Antibióticos: negativo
- j) Células somáticas: menos de 400000
- k) Masa inicial

Si las mediciones realizadas se encuentran dentro de los parámetros aceptables la leche puede ser procesada, de lo contrario hay que rechazarla, ya que se pueden presentar problemas de inocuidad o calidad en el producto terminado. Si se recibe leche recién ordeñada debe estar a 37 °C y no haber pasado más de 2 horas después del ordeño.

2. Pasteurizar la leche calentando a 65 °C y manteniendo a esta temperatura durante 30 min, durante el calentamiento se debe agitar constantemente.
3. Enfriar la leche a 35-38 °C.
4. Añadir el cultivo siguiendo las indicaciones de los proveedores (Ver Anexo 1. Ejemplo de cálculo para la adición de cultivo). Mezclar constantemente y asegurarse de que se lleve a cabo una distribución homogénea.
5. Realizar el lavado y desinfección de los envases utilizando jabón de grado alimentario tanto en el cuerpo del envase como en la tapa, seguidamente un enjuague con agua potable y por último utilice una solución desinfectante de grado alimentario. (Ver Anexo 2. Procedimiento de desinfección de botellas y tapas con hipoclorito de sodio “cloro”).
6. Envasar la leche en botellas de plástico limpias, desinfectadas y de grado alimentario.
7. Dejar fermentar la leche al menos durante 12 h a temperatura ambiente (puede ser de un día para otro) o hasta llegar a un pH de 4,40 asegurándose que el producto no supere 24 h posterior a la adición del cultivo.
8. Refrigerar a 5 °C o menos. Esta temperatura se debe mantener durante el almacenamiento, distribución y comercialización de la leche agria.

Consideraciones especiales

- Cambios en la formulación y procedimiento indicado en este documento son inválidos sin la aprobación de una autoridad de proceso especialista en el procesamiento y la inocuidad de productos derivados lácteos.
- Si la leche no ha sido filtrada durante el ordeño se debe filtrar apenas ingresa a la planta, para esto se recomienda utilizar filtros de papel desechables. Si se utilizan mantas, hay que asegurarse que estén limpias y desinfectadas.
- Para la comercialización del producto en Centroamérica asegúrese que cumple con las recomendaciones del "Reglamento Técnico Centroamericano de Buenas Prácticas de Manufactura, RTCA 67.01.33:06" Disponible en: dirección <http://faolex.fao.org/docs/pdf/nic98358.pdf>.
- Mantenga registros de los factores críticos (tiempo y temperatura de pasteurización, pH del producto final, temperatura de almacenamiento).
- Para asegurar la efectividad de los parámetros críticos asegúrese que utiliza dispositivos de medición calibrados (pH metro, termómetro, etc.).
- \leq significa menos o igual a y \geq significa mayor o igual a.

Vida útil estimada

La vida útil del producto descrito en este documento debe determinarse por medio de un estudio formal en el que se evalúe el deterioro físico, microbiológico, químico y sensorial (ej. cambio de color, modificación de textura o sabor) que supere el límite de aceptabilidad en los parámetros de calidad predeterminados para el consumidor.

Requisitos de etiquetado

Para comercializar un producto envasado en Costa Rica debe cumplirse con las disposiciones del Reglamento de Etiquetado General de los Alimentos Previamente Envasados (RTCA 67.01.02:10). A continuación, se presenta una lista de verificación de cumplimiento del producto con este reglamento.

- 1. Nombre del alimento:** Debe indicar la verdadera naturaleza del producto, en un campo de visión tal que en una sola mirada el consumidor pueda apreciar la información. En este

caso indicar claramente en la etiqueta “Leche pasteurizada”, “Almacénese en refrigeración” y la fecha de expiración del producto.

2. **Lista de ingredientes:** Los ingredientes deben aparecer en orden decreciente (de mayor a menor) según la proporción de masa (peso) inicial en el momento de la fabricación del alimento. Importante: Se debe declarar cualquier aditivo alimentario e ingrediente que pueda causar alergia o un efecto no deseado en las personas; entre estos alimentos se consideran: cereales que contienen gluten, crustáceos y sus productos, huevos y sus productos, pescado y productos pesqueros, maní, soya y sus productos, leche y productos lácteos, nueces y sus derivados, sulfito en concentraciones de 10 mg/kg o más.
3. **Contenido neto:** Debe aparecer en el mismo campo de visión del nombre del alimento, expresado en unidades del Sistema Internacional (SI), en volumen para alimentos líquidos, en peso para alimentos sólidos.
4. **Nombre y dirección:** del fabricante, envasador, distribuidor, importador o vendedor del alimento.
5. **País de origen:** Debe indicar “Costa Rica”.
6. **Identificación del lote:** Debe estar expresado con claridad, si se encuentra junto a otra información numérica debe ser identificado con frases como: “número de lote”, “lote”, “N. de lote”, “Lot”, “L” (cuando la codificación inicie con L), “N.L”.
7. **Fecha de vencimiento:** Debe ser colocada por el fabricante, debe ser clara (no induce confusión) y no debe estar oculta. Debe incluir día, mes y año para productos con fecha de vencimiento no superior a tres meses, en caso de que la fecha de vencimiento sea mayor a tres meses solamente se indica mes y año.
8. **Instrucciones de uso y conservación** de los alimentos.
9. **Registro Sanitario del Ministerio de Salud:** Debe estar precedido por cualquiera de las siguientes frases: “R.M.S.”, “RG. MS”, “Reg. San”, “Reg. Sanitario”, “No. Registro Sanitario”, o cualquier otra frase que indique claramente al consumidor el número de registro sanitario.

Si se destaca alguna propiedad nutricional del producto se debe incluir un etiquetado cuantitativo de los ingredientes (tabla nutricional) el cual se rige por el reglamento “RTCA 67.01.60:10 Etiquetado nutricional de productos alimenticios preenvasados para consumo humano para la población a partir de 3 años de edad”.

El CITA realiza este servicio, puede consultar los precios y paquetes en la recepción (teléfono 2511-7223).

Anexos

Anexo 1. Ejemplo de cálculo para la adición de cultivo

Para la realización del cálculo se utilizó la ficha técnica del cultivo cuyo nombre comercial es R704 y que es distribuido por Chr. Hansen.

- Pasos para la realización del cálculo según los litros de leche:
 1. Mida la masa del sobre que contiene el cultivo. El sobre debe estar intacto, sin haber sido abierto ni utilizado.
 2. Según la ficha técnica, 1 sobre equivale a 50 U. Asimismo, 50 U sirven para inocular una cantidad de 500 L de leche.
 3. Hacer la siguiente relación:

$$\text{Gramos (g) de cultivo a utilizar} = \text{Masa del sobre (g)} \frac{500 \text{ Litros (L)}}{\text{Litros de leche a utilizar}}$$

4. En la fórmula anterior, se conoce la masa del sobre y los litros de leche que se van a utilizar para la elaboración del producto. El valor que se averigua es la cantidad de cultivo en gramos que se debe agregar a dicha cantidad de leche.
- Cuidados:
 - a. Utilice las mismas unidades de masa y volumen.
 - b. Puede realizar el cálculo utilizando una medida de masa para la cantidad de leche utilizando los siguientes factores de conversión: 1,032 gramos (g) de leche = 1 mililitro (mL) de leche, 1 kilogramo (kg) = 1000 g, y 1 L = 1000 mililitros.

Anexo 2. Procedimiento de desinfección de botellas y tapas con hipoclorito de sodio “cloro”

Una vez que las botellas y tapas hayan sido lavadas y se haya removido de manera efectiva el jabón, se procede a la preparación de una solución de 1000 ppm (partes por millón) de hipoclorito de sodio en agua potable.

Para calcular el volumen de hipoclorito que se necesita para preparar la solución a 1000 ppm se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de hipoclorito (mL) para 1L de agua} = \frac{1000}{\text{Concentración comercial } (\frac{g}{L})}$$

Por lo tanto, si se tiene una marca comercial de cloro, con un 5,25% de concentración, el cálculo se realizaría de la siguiente manera:

$$5,25\% = \frac{5,25 \text{ g}}{100 \text{ L}} = 0,0525 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

$$\text{Volumen de hipoclorito (mL) para 1L de agua} = \frac{1000}{0,0525} = 19 \text{ mL de hipoclorito por L de agua}$$

Cuando la solución esté lista, se procede a sumergir las botellas y las tapas asegurando que todo el interior entre en contacto con la solución durante 15 min.

Por último, se debe realizar un enjuague con agua potable tanto en el interior como en el exterior de las botellas y tapas.

Nota: Este procedimiento es válido únicamente para la desinfección con cloro de superficies en contacto directo con los alimentos. Para el uso de cualquier otra sustancia desinfectante debe consultarse al proveedor de la misma.

Referencias

FDA. 2013. Food Code. INTERNET:
<https://www.fda.gov/downloads/food/guidanceregulation/retailfoodprotection/foodcode/ucm374510.pdf>

Reglamento Técnico Centroamericano RTCR: 401-2006. Leche cruda y Leche Higienizada. Especificaciones

Viquez, D. 2012. Caracterización de la producción artesanal de queso en las empresas de la Cámara Nacional de Queseros Artesanos y Afines (CANAQUEAF), capacitación de sus miembros y elaboración de una propuesta de plan de acción que permita revalorizar los quesos artesanales. Tesis Lic. en Ingeniería de Alimentos, Escuela de Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, San José.

9.6.6. *Actividad para uso de la hoja de control*

A continuación se describen las actividades realizadas para la elaboración de leche agria. Utilice la información para completar la hoja de control de proceso. Si usted encuentra alguna práctica mal hecha o que no se encuentra, y considera necesario corregirla o agregarla, márkela y proponga una solución.

En la empresa “La vaca Lula” se han dedicado a la producción de productos lácteos fermentados. Sin embargo, desean empezar a producir leche agria debido a que algunos clientes les han pedido dicho producto porque quieren hacer tamal asado en sus casas. Al anotar los pedidos, se dan cuenta que necesitan elaborar 20 L de leche agria.

El día siguiente empiezan las labores para la producción de leche agria. El encargado de recibir la leche se llama Juan Mora. Juan llega a la planta a las 4:50am, se anota en el registro de entrada y se va a los vestidores. Él se coloca las botas y la gabacha y se dirige a la sección de lavado de manos y pediluvio. Cuando Juan quiere lavarse las manos se percató de que no hay jabón y decide hacer un enjuague con agua, seguidamente limpia sus botas y se dirige al pediluvio con la solución desinfectante antes de ingresar a la zona de producción.

A las 5:15 am ingresa el primer lote de leche, Juan recibe la leche y la pesa en una balanza, obteniendo un resultado de 87 kg en un balde de 1 kg. Después mide la temperatura, el termómetro indica 4 °C. Por último, realiza las siguientes mediciones: pH=6,9; Sólidos no grasos=8,5%; Proteína=3,5%; Grasa=3,5%; Densidad=1,030; Punto crioscópico= -0,520; Antibióticos= Negativo y Células somáticas= 1 000 000.

Después de este lote, a los 15 min Juan recibe un segundo lote, de la finca de don Pablo Zamora, quien le indica que acaba de ser ordeñada. Con este lote Juan repite los pasos anteriores y obtiene los siguientes resultados: Masa de leche en el balde= 45 kg; Temperatura de la leche= 37 °C; pH = 6,7; Sólidos no grasos=9%; Proteína=4%; Grasa=4,5%; Densidad=1,031; Punto crioscópico= -0,515; Antibióticos= Negativo y Células somáticas= 100 000.

Posteriormente, Juan le pasa la leche del segundo lote a Carmen, ella es la encargada del proceso de pasteurización. A las 6:00 am Carmen coloca 20 kg de leche en una olla y empieza a calentar y a agitar. A las 6:20 am se da cuenta que la leche ya alcanzó los 65°C entonces deja de agitar y apaga la plantilla. A los 5 min vuelve a medir la temperatura y está a 65,5°C, a las 6:40 am la temperatura es de 63,5°C y a las 6:50 am es de 65°C. Al terminar los 30 min, Carmen comienza a enfriar la leche hasta alcanzar una temperatura de 37°C y agrega 0,3 g de cultivo

láctico. Después de esto, traslada la leche a un balde limpio y desinfectado y le pone una tapa que indica el lote, y la hora de inicio a las 7:00 am. El balde lo coloca en la zona de incubación, donde el termorregistrador indica una temperatura de 25 °C.

Al día siguiente, Carmen ingresa a planta para terminar el proceso de elaboración de la leche agria. Ella se pone la gabacha, cofia y botas e ingresa por la puerta del costado del edificio, esta tiene acceso directo a la zona de producción. Una vez adentro se lava las manos y se dirige a la zona de incubación. Al tomar el balde, se fija que la temperatura ambiente está a 23,5 °C y realiza la medición de pH. El pHmetro indica 4,35. Después de esto, Carmen coloca el balde en la cámara de refrigeración mientras ella lava y desinfecta los envases y tapas. Una vez hecho esto, ella procede a mezclar y envasar el producto. Una vez envasado, lo coloca de nuevo en la cámara de refrigeración que indica una temperatura interna de 4,9 °C.

9.6.7. Hoja de control

HOJA DE CONTROL DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE LECHE AGRIA	
Responsable: _____ Fecha: _____	
Lote: _____	
Etapa	Parámetros de control
Recibo	Proveedor: _____ Hora de recibo: _____
	Masa inicial leche: _____ Temperatura: _____
	pH: _____ Agua añadida: _____
	Proteína: _____ Densidad: _____
	SNG: _____ Pto. Crios: _____
	Antibióticos: _____ Células somáticas: _____
	Proveedor: _____ Hora de recibo: _____
	Masa inicial leche: _____ Temperatura: _____
	pH: _____ Agua añadida: _____
	Proteína: _____ Densidad: _____
	SNG: _____ Pto. Crios: _____
	Antibióticos: _____ Células somáticas: _____
	Proveedor: _____ Hora de recibo: _____
	Masa inicial leche: _____ Temperatura: _____
	pH: _____ Agua añadida: _____
	Proteína: _____ Densidad: _____
	SNG: _____ Pto. Crios: _____
	Antibióticos: _____ Células somáticas: _____
	Proveedor: _____ Hora de recibo: _____
	Masa inicial leche: _____ Temperatura: _____
	pH: _____ Agua añadida: _____
	Proteína: _____ Densidad: _____
	SNG: _____ Pto. Crios: _____
	Antibióticos: _____ Células somáticas: _____

**HOJA DE CONTROL DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE LECHE
AGRIA**

Responsable: _____ **Fecha:** _____
Lote: _____

Etapa	Parámetros de control
Pasteurización 65 °C por 30 min	Hora: _____ Temperatura: _____
	Hora: _____ Temperatura: _____
	Hora: _____ Temperatura: _____
	Hora: _____ Temperatura: _____
Enfriamiento	Temperatura: _____
Inoculación	Masa de cultivo: _____
Incubación 12 h a temperatura ambiente pH ≤ 4,4	Hora inicio: _____ Temperatura: _____ pH inicial: _____
	Hora final: _____ Temperatura: _____ pH final: _____
Envasado	Lavado y desinfección: (ver registro)
Almacenamiento	Temperatura de la cámara de refrigeración: _____
Observaciones	

9.7. Imágenes tomadas durante la aplicación del taller de capacitación

