



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**USO DE BACTERIAS LÁCTICAS Y  
RESAZURINA PARA MONITOREAR LA  
CADENA DE FRÍO DE PRODUCTOS  
PERECEDEROS**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**  
**MARTHA PATRICIA TAFOLLA RODRÍGUEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente: María Mercedes Palao Rincón  
Vocal: María del Carmen Wachter Rodarte  
Secretario: Pablo Pérez Gavilán Escalante  
1er. Sup: Aurora Irma Ortegón Ávila  
2do. Sup: Beatriz de Guadalupe Serrano López

Sitio en donde se desarrollo el tema:

U.N.A.M  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología

Asesor del tema:

M. en C. Pablo Pérez Gavilán Escalante -----

Supervisor técnico:

Q.A. Luis Macedo Segura -----

Sustentante:

Martha Patricia Tafolla Rodríguez -----

## ***AGRADECIMIENTOS***

### **A la Universidad Nacional Autónoma de México**

Por ser mi segunda casa y brindarme las herramientas para crecer profesional y personalmente.

### **Al Dr. Pablo Pérez-Gavilán Escalante**

Por su amistad y valiosa asesoría en este proyecto.

### **Al Q.A. Luis Macedo Segura**

Por su paciencia, el gran apoyo, los consejos y sobre todo su amistad que me brindo durante el desarrollo de esta tesis.

### **A los miembros del jurado**

Por sus consejos y aportaciones a esta tesis.

### **A todos mis profesores**

Y a todas aquellas personas que de alguna manera influyeron para la culminación de mi carrera, en especial al: M. en C. Benjamín Ruiz Loyola y al M. en C. Mario Alberto Maldonado Tapia<sup>†</sup>, quienes me demostraron que además de ser unos grandes profesores también son grandes amigos, gracias por sus consejos y apoyo.

### **A mis grandes amigos QA's**

Liz, Marianita y Hector por su amistad, apoyo, complicidad, consejos y por los buenos momentos que pasamos durante toda la carrera.

### **A mis amigos**

Y a todos aquellos que hicieron más amenos los días en la Facultad: Elias, Cuahutemoc, Alan, Isabel, Toño y Marvin.

### **A mis amigos del laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas**

Lety, Bety, Rocío y Alejandro por su amistad, apoyo, consejos y por hacer del laboratorio un lugar de trabajo muy agradable.

### **A Dios**

Por ayudarme a seguir adelante y sobre todo por darme salud y bienestar

## DEDICATORIA

*A mis Padres*

*Rosa María y Raúl: Gracias por sus desvelos y cuidados, por su paciencia, confianza, apoyo y sobre todo gracias por su amor*

*A mis hermanos*

*Pepe: Gracias por ser un buen ejemplo a seguir, por los regaños, el apoyo y la confianza.*

*Raúl: Gracias por ser mi compañero de la infancia y nunca dejarme sola desde que entre al CENDI.*

*Angie: Gracias por ser la hermanita que siempre pedí, a pesar de que somos muy diferentes sabes que te quiero mucho.*

*A Marco A. Martínez*

*Gracias por tu amor, tu confianza, consejos y todo el apoyo que me brindaste para lograr culminar una de las etapas más importantes de mi vida. Te amo*

*A mi Abuelita Luisa y mis Tías Toña, Aurora, Gina y Bety  
Gracias por sus cuidados y apoyo*

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>La Cadena de Frío en la Industria de Alimentos .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Clasificación de los Alimentos .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1.1</b>	<b>Alimentos Perecederos .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1.2</b>	<b>Alimentos Semi-perecederos.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.1.3</b>	<b>Alimentos No Perecederos .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Cadena de Frío .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Alteraciones debidas a una Refrigeración deficiente .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1.4</b>	<b>Monitoreo de la cadena de frío .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1.4.1</b>	<b>Microbiología predictiva .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1.4.2</b>	<b>Indicadores Tiempo-Temperatura .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1.4.3</b>	<b>Integración de sistemas .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1.4.4</b>	<b>Caracterizar la cadena de frío .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Bacterias Lácticas .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Generalidades .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.2</b>	<b><i>Lactococcus</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Metabolismo de Lactosa .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.3.1</b>	<b>Transporte e hidrólisis de Lactosa .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.3.2</b>	<b>Conversión de hexosa a triosa fosfato .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.3.3</b>	<b>Conversión de triosa fosfato a piruvato .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.3.4</b>	<b>Conversión de piruvato a lactato .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Uso de las Bacterias Lácticas en los alimentos.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3</b>	<b>Indicadores Redox.....</b>	<b>25</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Características de la Resazurina .....</b>	<b>25</b>

# ÍNDICE

2.3.2	Usos de la Resazurina .....	26
2.3.2.1	Equipo para determinar la calidad microbiológica de la leche .....	27
3	OBJETIVOS .....	30
3.1	General .....	30
3.2	Específicos .....	30
4	MATERIALES Y MÉTODOS .....	31
4.1	Microorganismos .....	31
4.2	Medios de cultivo .....	31
4.2.1	Leche descremada al 11% de sólidos totales .....	31
4.2.2	Agar APT para cuenta en placa .....	31
4.2.3	Medio Industrial para curva de crecimiento .....	32
4.2.4	Medio 1 como medio de dilución .....	32
4.3	Metodología .....	33
4.3.1	Activación de la cepa <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> .....	33
4.3.2	Curva de crecimiento .....	34
4.3.3	Efecto de la concentración de <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> en el cambio de color de la resazurina con respecto al tiempo a temperatura ambiente y temperatura de refrigeración .....	34
4.3.4	Efecto de la temperatura en la viabilidad de las Bacterias Lácticas secadas en papel filtro .....	35
4.3.4.1	Cuenta de microorganismos viables .....	35
4.3.5	Presentación del kit .....	36
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	37
5.1	Curva de crecimiento .....	37

# ÍNDICE

5.2	Efecto de la concentración de <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> en el cambio de color de la resazurina con respecto al tiempo a temperatura ambiente y temperatura de refrigeración .....	39
5.3	Efecto de la temperatura en la viabilidad de las Bacterias Lácticas secadas en papel filtro .....	43
5.4	Presentación del kit .....	47
5.5	Método para el uso del Kit de Monitoreo de la Cadena de Frío .....	47
5.6	Comparación del método de bacterias lácticas y resazurina con otros métodos utilizados .....	48
6	CONCLUSIONES .....	50
7	RECOMENDACIONES .....	51
8	BIBLIOGRAFÍA .....	52

## 1.- INTRODUCCION

Durante el manejo de los alimentos perecederos con frecuencia ocurren desviaciones significativas de la temperatura ideal de almacenamiento, transporte y exhibición, ya sea por manejo inadecuado del proceso o por errores de manipulación durante su distribución y comercialización. Esto se refleja en la pérdida de la calidad del alimento y disminución en la vida de anaquel lo que dificulta su comercialización; además el deterioro del alimento por crecimiento microbiano que en el mayor de los casos produce graves daños a la salud del consumidor y también generan pérdidas económicas a los productores y distribuidores de dichos alimentos.

El valor de la temperatura crítica a mantener depende de los microorganismos que pueden predominar en el producto así como de sus factores intrínsecos (pH,  $a_w$ ).

Para la mayoría de los alimentos, se recomienda que la cadena de frío se mantenga para refrigeración dentro de un rango de temperatura máximo de 4°C o si es para congelación no mayor de -18 °C. Desafortunadamente, los sistemas de producción y los canales de distribución no siempre cuentan con el equipamiento necesario para cumplir con esta recomendación.

Todo esto conlleva a buscar nuevas formas de controlar y monitorear la cadena de frío para optimizar la calidad de los productos que reciben los consumidores.

En este proyecto, basándonos en el principio del Kit de resazurina para el control microbiológico de la leche (Patente 170279, UNAM) se planteó la idea de desarrollar un Kit a base de bacterias lácticas y resazurina que sirva para monitorear la cadena de frío de los productos refrigerados y nos indique por medio de un cambio de color en la resazurina si la cadena de frío en algún momento se rompió.

Sabiendo que *Lactococcus lactis subspecies lactis* (*L. lactis ssp. lactis*) posee una intensa fuerza reductora y tiene una temperatura óptima de crecimiento

entre 20 y 30°C, al ponerla en un medio adecuado y en presencia de resazurina formarán lo que es el Kit de monitoreo.

Si el alimento es correctamente refrigerado *L. lactis spp lactis* no producirá los agentes reductores que generan el cambio de color en la resazurina, pues no se encuentra a su temperatura óptima de crecimiento, pero si la cadena de frío se rompe *L. lactis ssp lactis* comenzará sus procesos metabólicos lo que se manifestará con el cambio de color de la resazurina.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 La Cadena de Frío en la Industria de Alimentos**

Muchos alimentos proporcionan un medio apto para el crecimiento de microorganismos, pues proveen los nutrientes y la  $a_w$  necesarios para el desarrollo de estos. Durante el crecimiento de algunos microorganismos se producen cambios en las características organolépticas del alimento, es decir, en la apariencia, olor o sabor. Estas alteraciones o cambios no son necesariamente negativas ni peligrosas para la salud del consumidor, pero en algunos casos la alteración es producida por organismos patógenos, lo que hace al alimento no apto para el consumo.

Por tal motivo existen varios métodos de conservación y almacenamiento que inhiben o detienen el crecimiento de los microorganismos que causan la alteración de los alimentos y de los que pueden ser patógenos para el hombre. Uno de estos métodos es la conservación por frío. Aquí la temperatura juega un papel muy importante pues un control adecuado de ésta es imprescindible para alargar la vida útil del producto.

#### **2.1.1 Clasificación de los Alimentos**

Los alimentos se pueden clasificar en tres categorías principales dependiendo del grado de susceptibilidad a la actividad microbiana: (1) alimentos perecederos, (2) alimentos semi-perecederos y (3) alimentos no perecederos; estas categorías de alimentos se diferencian en cuanto al contenido de  $a_w$  y cada una de estas tendrá diferentes condiciones de almacenamiento (Madigan *et. al.*, 2004).

##### **2.1.1.1 Alimentos Perecederos**

Los alimentos perecederos son aquellos que por sus características naturales y porque poseen una alta actividad de agua ( $a_w$ ) se descomponen muy

rápidamente y que para su conservación requieren condiciones de temperatura regulada.

Son clasificados como productos altamente perecederos cuando tienen una  $a_w$  elevada y pH cercano al neutro,  $a_w > 0.95$  y  $pH > 5.2$ , pero cuando el pH y  $a_w$  son menores, pH 5.2 a 5.0 y  $a_w$  entre 0.95 y 0.91, el producto se clasifica como perecedero (Li y Torres, 1993).

Muchos de los alimentos que se utilizan cotidianamente son perecederos como por ejemplo: la mayoría de las frutas y verduras, carnes, aves, pescados, mariscos, lácteos, entre otros.

#### **2.1.1.2 Alimentos Semi-perecederos**

Son aquéllos alimentos de actividad de agua intermedia ( $a_w = 0.8$ ) como las papas, manzanas, nueces, nabos, zanahorias, mermeladas, etc. que si se manejan y almacenan adecuadamente permanecen sin deteriorarse por algún tiempo, de varias semanas a meses.

#### **2.1.1.3 Alimentos No Perecederos**

Los alimentos no perecederos son aquéllos que tienen una baja actividad de agua ( $a_w$ ) y pueden ser almacenados durante largos periodos de tiempo sin que se deterioren a menos que se traten sin cuidado. Por ejemplo: azúcar, harina, arroz, pastas para sopa y legumbres secas.

#### **2.1.2 Cadena de Frío**

En la antigüedad el hombre notó que en invierno sus alimentos se conservaban en mejores condiciones que en el verano, así que empezó a buscar el modo de que sus alimentos se conservaran por más tiempo. Los pueblos nórdicos enterraban en la nieve lo que deseaban guardar para un consumo posterior. Los romanos envolvían con nieve el pescado del Rin, las langostas de Cerdeña o las ostras de Armónica para transportarlos hasta Roma en buen estado.

El frío va a inhibir los procesos alterantes, ya sean bacterianos y/o enzimáticos, de una forma total o parcial. Existen dos tipos de conservación a través del frío: la congelación (largo plazo) y la refrigeración (días-semanas). Al disminuir la temperatura reducimos la velocidad de crecimiento de los microorganismos. Según la temperatura se pueden establecer los siguientes niveles (Villanua, 1990):

- A  $-4^{\circ}\text{C}$  Se inhibe el crecimiento de los microorganismos patógenos. Estos son peligrosos para la salud ya que producen toxinas que pueden provocar intoxicaciones y en los casos mas graves la muerte.
- A  $-10^{\circ}\text{C}$  Se inhibe el crecimiento de los microorganismos responsables de la degradación de los alimentos.
- A  $-18^{\circ}\text{C}$  Se inhiben todas las reacciones de Maillard responsables del oscurecimiento de los alimentos.
- A  $-70^{\circ}\text{C}$  Se anulan todas las reacciones enzimáticas y el alimento se conserva por largos periodos de tiempo (1 a 12 meses).

Tanto la congelación como la refrigeración detienen la actividad bacteriana, no la eliminan. Si se altera la cadena de frío, las bacterias reanudan su actividad, si se vuelve a reducir la temperatura volverá a inhibirse la actividad bacteriana, pero contaremos con un número mucho mayor de bacterias que antes del aumento de temperatura. Cuanto mayor sea el número de bacterias, mayor es la probabilidad de que el alimento se deteriore, que las bacterias produzcan toxinas ó se desarrollen las bacterias que causan infecciones.

La cadena de frío se define como el sistema logístico que comprende al personal, al equipo y a los procedimientos para almacenar, transportar y mantener a la temperatura correcta los alimentos de tal forma que se conserven sus características de calidad e inocuidad, desde el momento en que dejan la planta de manufactura, durante su transporte y almacenamiento y hasta el momento en que llegan al cliente final.

Los eslabones de la cadena de frío son:

- Pre-enfriamiento
- Almacenamiento en frío antes de transportarse para comercializarse

- Transporte refrigerado
- Cámara refrigerada en los puntos de venta
- Exhibición y venta en un equipo refrigerado

El punto crítico es el tiempo de carga y descarga en cada uno de los eslabones, estos repercuten negativamente en la conservación de los productos.

### 2.1.3 Alteraciones debidas a una Refrigeración deficiente.

La pérdida de la calidad y la disminución de vida útil de los alimentos perecederos son causadas por el mal uso de la temperatura ideal, ya sea que se someta a temperaturas muy altas o muy bajas. Por ejemplo, las altas temperaturas pueden causar pérdida de vitamina C en los espárragos y disminución en el azúcar o sacarosa del maíz dulce (Manual de agricultura, 1995). Las bajas temperaturas pueden causar daños en frutas y verduras frescas como: maduración inadecuada, disminución del sabor, decoloración y deterioro fisiológico.

Sin embargo el efecto más grave que sufren los alimentos perecederos es el crecimiento de microorganismos patógenos, alcanzando niveles que causan enfermedades o intoxicaciones en los consumidores. En EUA, el aumento de temperatura durante la refrigeración de alimentos, es la principal causa de origen de casos de enfermedades transmitidas por alimentos (tabla 1) (Ray, 2004).

**Tabla 1. Factores predominantes asociados a casos de enfermedades transmitidas por alimentos por bacterias patógenas en Estados Unidos de América (EUA) entre 1988 y 1992**

<b>FACTOR</b>	<b>CASOS</b>	<b>% DE CASOS</b>
Aumento de temperatura (refrigeración inadecuada)	848	36.1
Higiene personal	554	23.6
Cocimiento inadecuado	401	17
Contaminación cruzada por equipo	229	9.8
Alimentos de fuentes inseguras	161	6.9
Otros	155	6.6
<b>TOTAL</b>	<b>2348</b>	<b>100</b>

La mayor parte de los alimentos perecederos como por ejemplo productos cárnicos son sometidos a diversos procesos que disminuyen la carga y variedad inicial de microorganismos con lo que se incrementa la vida útil del producto.

Las bacterias causantes de deterioro son en su mayoría psicrótrofas, capaces de crecer entre 0 y 4°C a un ritmo muy lento pero el crecimiento es acelerado cuando se producen aumentos de temperatura en algún punto de la cadena de frío.

Ciertos alimentos perecederos son identificados con mayor frecuencia como causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (tabla 2) (Ray,2004)

**Tabla 2. Tipos de alimentos asociados con casos de enfermedades transmitidas por alimentos de origen bacteriano en Estados Unidos de América (EUA) entre 1983 y 1988.**

<b>Tipo de Alimento</b>	<b>No de casos</b>	<b>%</b>	<b>Patógenos predominantes</b>
Productos cárnicos	91	14.6	<i>Salmonella</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Pescado y sus productos	20	3.2	<i>Clostridium botulinum</i>
Huevo y sus derivados	11	1.8	<i>Salmonella</i>
Productos lácteos	26	4.2	<i>Salmonella</i>
Ensaladas	33	5.3	<i>Salmonella</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Shigella spp</i>
Frutas y vegetales	44	7	<i>C. botulinum</i>
Bebidas	3	0.5	<i>C. botulinum</i>
Comidas étnicas	19	3	<i>C. perfringens</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Salmonella</i>
Alimentos compuestos	123	19.7	<i>Salmonella</i>
Otros alimentos	254	40.7	<i>Salmonella</i> <i>Shigella spp.</i>
<b>Total</b>	<b>624</b>	<b>100</b>	

Los principales patógenos en productos cárnicos refrigerados son *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus*; *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus* están asociados a productos pasteurizados refrigerados; y *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri* y *Escherichia coli* O157:H17 son frecuentes en productos cárnicos, pescados y mariscos refrigerados (Tirado *et al.* 2005).

La presencia de 15 a 20 células de *Salmonella* en un alimento puede producir infecciones intestinales y aunque no compite con otros microorganismos a temperatura de refrigeración, se desarrolla cuando se producen aumentos de temperatura (15 a 20°C). En EUA es la segunda causa más común de enfermedades transmitidas por alimentos, origen: huevos crudos, pollos, carnes mal cocidas, productos lácteos, mariscos, frutas y verduras. *C. perfringens* y *B. cereus* sobreviven tratamientos térmicos formando esporas que al germinar se pueden reproducir a bajas temperaturas debido a su naturaleza psicrótrofa. Cuando alcanzan un nivel de  $10^6$  células por gramo de alimento provocan intoxicaciones al esporular en el intestino (Prescott *et al.*, 2004). *L. monocytogenes* puede causar listeriosis una enfermedad grave en mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos con sistema inmune débil, causa septicemia, meningitis, encefalitis y otras infecciones cuando un alimento contiene más de 1000 células. Se ha encontrado en productos lácteos, incluyendo quesos blandos así como también en carne cruda y mal cocida, pollos y productos del mar. *Listeria monocytogenes* es una bacteria psicrótrofa que resiste bajas temperaturas. Además su crecimiento se ve acelerado con el aumento de población de *Pseudomonas spp.* (Lebert *et al.*, 2000). *Y. enterocolitica* crece muy lentamente a bajas temperaturas y no se conoce la dosis que provoca infecciones. Se caracteriza por sus síntomas similares a apendicitis pero con aparición de diarrea, origen: productos lácteos y agrícolas. En refrigeración, *Shigella flexneri* es capaz de competir con otras bacterias y solo 10 células en un alimento son suficientes para provocar una infección intestinal. *E. coli* O157:H17 causa infección en la misma ingesta pero no crece a temperaturas bajas, origen: carnes

mal cocidas, leche cruda y productos agrícolas. (Jay, 1992; Tirado *et. al.*, 2005; [www.FoodSafety.gov](http://www.FoodSafety.gov)).

#### **2.1.4 Monitoreo de la cadena de frío.**

El monitoreo de la temperatura en todas las etapas de la cadena de frío de un producto durante su producción, distribución y almacenamiento permite a los procesadores establecer fechas de caducidad precisas de acuerdo con las condiciones reales de tiempo y temperatura a las que fue sometido un alimento. Estudios sobre el perfil de tiempo-temperatura durante la distribución de productos cárnicos refrigerados han demostrado que los límites de temperatura son excedidos con mayor frecuencia en las estanterías de los supermercados (James, 1996).

Existen medidas efectivas para evitar o disminuir la ocurrencia y frecuencia de los aumentos de temperatura en los alimentos perecederos durante toda su distribución hasta llegar al consumidor final. Algunas de estas medidas se mencionan a continuación:

##### **2.1.4.1 Microbiología predictiva.**

McMeekin *et al.* (1993) definió el término de microbiología predictiva como una ciencia que evalúa cuantitativa y objetivamente el efecto de las operaciones de procesamiento, distribución y almacenamiento en la seguridad y calidad microbiológica de los alimentos. Dicha ciencia se basa en la aplicación de modelos matemáticos que relacionan la cinética de crecimiento microbiano con las propiedades extrínsecas (temperatura, condiciones de aerobiosis, etc.) e intrínsecas (pH, actividad de agua, etc.) de un alimento (Tirado *et. al.*, 2006).

El ciclo de crecimiento de una población de microorganismos consta de las fases de latencia, exponencial, estacionaria y declinación. Los investigadores de microbiología predictiva se han enfocado a modelar el efecto de la fluctuación de temperatura sobre las dos primeras fases bajo la premisa de que si la población microbiana alcanza la fase estacionaria, el producto está deteriorado o presenta riesgos para la salud del consumidor.

Mediante la aplicación de esta técnica se identifican y cuantifican los parámetros críticos que afectan la calidad y seguridad de los alimentos en cualquier punto de la cadena de frío. Con ayuda de una herramienta computacional para evaluar el efecto de la duración de los aumentos de temperatura en un medio líquido se demostró que cuando se expone un alimento a una temperatura mayor a la establecida (20°C) por sólo un 2-3% del tiempo de almacenamiento, la vida útil puede disminuir en un 20-30%. Koutsoumanis (2001) estudió en *Sparus aurata* el comportamiento de la microbiota natural en condiciones aeróbicas y con diferentes perfiles de aumentos de temperatura. La vida útil del producto en condiciones de temperatura constantes a 0 y 2°C fue de 10 días, pero bajo condiciones dinámicas de temperatura, la vida útil disminuyó entre 27 y 75% dependiendo de la temperatura máxima del aumento (9 a 16°C)

La microbiología predictiva también puede ser implementada para predecir el crecimiento microbiano en la fase de enfriamiento después de un tratamiento térmico. Smith-Simpson y Schaffner (2005) desarrollaron un modelo matemático mediante el cual sugieren que el enfriamiento del producto cárnico desde 54.4°C a 26.7°C debe producirse en menos de 1.5h para asegurar un crecimiento menor a un ciclo logarítmico en la población de *C. perfringens*.

Los modelos usados en microbiología predictiva incluyen conceptos de crecimiento, disponibilidad de sustrato o crecimiento en función de la densidad de la población. Sin embargo para incorporar los factores externos, tales como temperatura, pH, humedad relativa, es común obtener curvas de crecimiento para diferentes combinaciones de factores externos y luego realizar regresiones de los efectos de estos factores sobre los parámetros del modelo, tales como la influencia de la temperatura en la velocidad de crecimiento. A estos últimos se les denomina modelos secundarios. En la tabla 3 se describen los modelos más comúnmente usados.

**Tabla 3. Modelos de microbiología predictiva y sus características.** (Tirado *et. al.*, 2005)

<b>Modelo</b>	<b>Características</b>
Gompertz	Modelo primario empírico más utilizado, genera una curva sinusoidal asimétrica que simula las fases latencia, exponencial y estacionaria. Este modelo es la base del

	<p>software PMP (<a href="http://www.arserrc.gov/mfs/">www.arserrc.gov/mfs/</a>).</p> <p>Inconvenientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.-Subestimación de la velocidad de crecimiento.</li> <li>2.-Requiere datos a lo largo de las fases de latencia, exponencial y estacionaria para una buena predicción.</li> <li>3.-Para ambientes con temperatura fluctuante, sus parámetros deben ser estructurados con modelos secundarios.</li> </ol>
Log logistic	<p>Modelo primario. Incorpora el término <math>1-N/N_{max}</math> permite que la velocidad de crecimiento decrezca hasta valores cercanos a cero a medida que la población se acerca al máximo, describiendo una curva convexa.</p> <p>Inconvenientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.-Carece de fase de latencia.</li> <li>2.-Esfuerzos de agregarle términos que permitan modelar la fase latencia da resultados de menor calidad que Gompertz</li> </ol>
Ratkowsky	<p>Modelo secundario. Permite modelar la velocidad de crecimiento en función de la temperatura e incorporarla a un modelo primario.</p> <p>Inconvenientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.-Sólo garantiza buena predicción en el rango de temperatura de los datos experimentales.</li> <li>2.-Bajo fluctuaciones continuas de temperatura no hay consistencia en el crecimiento microbiano que predice.</li> </ol>
Baranyi y Roberts	<p>Modelo primario. Introduce una variable asociada al consumo de un sustrato crítico y propone una función que ajusta el crecimiento con respecto al máximo posible.</p> <p>Ventajas:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.-La fase latencia se expresa mediante una función que ajusta el estado fisiológico de las células a una sola variable, permitiendo la modelación de las fases latencia y exponencial en forma continua.</li> <li>2.-Permite predecir el crecimiento microbiológico bajo fluctuaciones de temperatura.</li> </ol>
Modelos Polinómicos	<p>Modelos secundarios y primarios, que permiten la modelación de varios factores de crecimiento en forma simultánea y de forma bien precisa.</p>

	Inconvenientes: 1.-Suelen presentar comportamientos ilógicos por su naturaleza netamente empírica.
Baranyi y Roberts – Transferencia de calor	Predice el crecimiento microbiano en función de la temperatura del alimento, mediante software que simula en forma integrada la transferencia de calor y asocia la temperatura en forma dinámica con el modelo predictivo primario y secundario.

La elaboración de programas para el desarrollo de modelos de crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos ha sido iniciada en Estados Unidos, Reino Unido, Australia y otros países. Estos programas han generado diversos modelos que han sido incorporados en paquetes de software, los cuales están disponibles en línea. Cabe mencionar que los modelos matemáticos de la microbiología predictiva nunca serán imitadores perfectos de situaciones verdaderas, por lo que requieren ser manipulados por gente experta que sepa interpretar de manera correcta los resultados y explotar así los usos de esta herramienta.

#### **2.1.4.2 Indicadores Tiempo-Temperatura**

En la cadena de frío, incluso en aquellas con excelente equipamiento, se presentan aumentos de temperatura con una frecuencia y amplitud que en general se desconoce. Una forma eficiente de abordar esta problemática es el uso de registradores de temperatura incorporados en el contenedor utilizado para el transporte del producto. Dichos registros se recuperan y son enviados al departamento de control de calidad para implementar mejoras en el manejo del producto (Moore *et. al.*, 2003).

Otra alternativa es el uso de indicadores de tiempo-temperatura (TTI por sus siglas en inglés). Existen dos tipos, los que reflejan el efecto acumulativo de tiempo y temperatura por la exposición del producto a temperaturas superiores a un nivel crítico, y aquéllos que informan si el producto ha sido sometido a temperaturas superiores o inferiores a un valor establecido.

Ambos consisten en unas etiquetas adheridas al envase que informan de la historia térmica del producto basándose en distintos principios físico-químicos, tales como reacciones enzimáticas, fusión de compuestos, procesos de polimerización; reacciones que deben ser sensibles a la variación de la temperatura, produciendo el cambio de color de un indicador, gradual e irreversiblemente. Este cambio ocurre a una velocidad que depende de la temperatura a la que está expuesto el producto. (Brody, 2001; Moore y Sheldon, 2003).

Los Indicadores de Tiempo Temperatura pueden clasificarse en indicadores de historia parcial que no responderán a menos que se sobrepase la temperatura establecida, y en indicadores de historia completa que responderán independientemente de la temperatura crítica.

Los indicadores deben cubrir ciertas características como: que sean fácilmente activables y de uso sencillo, deben presentar una respuesta exacta e irreversible, con relación al deterioro del producto y con la cadena de distribución de tiempo y temperatura, además de que no deben suponer un riesgo para el consumidor en caso de ingestión.

En los últimos años en la Unión Europea es en donde se ha dado más el desarrollo de este tipo de sistemas indicadores. Ejemplos de etiquetas indicadoras comerciales son:

El indicador **FreezeWatch** (PyMaH. Corp.) es un simple indicador irreversible de temperatura, que al alcanzar una temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$ , el líquido contenido en una ampolleta se descongela y moja el papel indicador. Es ideal para productos que corren el riesgo de ser dañados cuando están expuestos a temperaturas de congelación. ([www.3M.com/microbiology](http://www.3M.com/microbiology))

**Chillchecker** (Termographic Measurements) contiene un papel indicador separado de un reservorio poroso que contiene un compuesto coloreado; al ponerse en contacto por la presión ejercida en el dispositivo se activa y al alcanzarse o superarse la temperatura de calibración se producirá la modificación del dispositivo.

Los indicadores **3M MonitorMark** (3M Packaging Systems) son indicadores de historia parcial que consisten en papel secante donde hay incorporados productos químicos con un punto de fusión característico y un compuesto azul, además de una guía por donde se difundirán los productos químicos una vez alcanzado el punto de fusión; ambas partes del dispositivo están separadas por una película de poliéster que se quita para activar el indicador. ([www.3M.com/microbiology](http://www.3M.com/microbiology))

Las etiquetas **Check Point** (Vitsab) son indicadores de historia completa que muestra respuesta independientemente de la temperatura establecida. Se basan en la hidrólisis enzimática de un lípido, el dispositivo consiste en dos partes, una contiene una mezcla de enzimas, la otra la solución del sustrato y un indicador de pH. Para activarlo, se rompe la separación entre las partes y ambos compuestos se mezclan. Mientras la reacción tiene lugar, la sustancia lipídica se hidroliza y el cambio de pH se observa con una variación de color. ([www.vitsab.com](http://www.vitsab.com))

Las etiquetas **Lifelines Fresh Scan** (Lifelines Technology Inc.) ofrecen también una historia completa independientemente de la temperatura umbral. Este sistema consiste en tres partes, indicador que contiene compuestos de polímeros que cambian de color como resultado de una acumulación a exposición de temperatura, un microcomputador con banda óptica para leer el indicador y un software para el análisis de datos.

Los indicadores **Lifelines Fresh-Check** son etiquetas con un anillo central, funciona con base en una reacción de polimerización por acción de la temperatura, se oscurece informando al comprador de no consumir el producto. Este dispositivo debe mantenerse en congelación antes de su uso para evitar que se active antes del tiempo previsto (Brody, 2001)

**Marupfroid** (París, Francia) ha desarrollado una etiqueta de historia parcial basada en el punto de fusión del hielo. Se coloca dentro del envase y cuando el producto se descongela se observa externamente la respuesta del indicador que consiste en un cambio de color del mismo.

**Oscar Mayer Foods Corp.** (Madison, USA) ha desarrollado un indicador de frescura de los productos, basado en un dispositivo con un compuesto sensible a los cambios de pH.

**Imago Industries** (La Ciotat, Francia) ha lanzado su reutilizable marcador de temperatura, cuyo elemento principal es una aleación con memoria de forma, ya que “memoriza” dos formas distintas según temperaturas predeterminadas.

Una patente de **Microtechnic** (Alemania) utiliza la aleación de dos imanes como indicador de la descongelación de la comida congelada.

Varias cadenas de supermercados europeas, incluyendo Monoprix en Francia y Albert Heijn en Holanda, aplican Fresh-Check sobre los empaques de alimentos como carne fresca, pescado, ensaladas, productos lácteos, jugos y pastas frescas. En EUA, Fresh-Check ha sido usado por la compañía Campbell y en las comidas preparadas refrigeradas listas para consumirse de las marcas Eatzl y Trader Joe, para alertar a los consumidores si ha ocurrido un aumento de la temperatura en el manejo del alimento. Vitsab es usado por British Airways, con lo que aseguran que los alimentos servidos no hayan presentado aumentos de temperatura y se encuentran dentro del rango de vida útil. Vitsab es también utilizado en empaque para distribución de pescados, ensalada precortada y carne molida (Brody, 2001).

Vanionpáá *et al.*, (2004) compararon diferentes métodos analíticos, entre ellos los indicadores de tiempo-temperatura con el objetivo de monitorear los cambios en la calidad de productos cárnicos refrigerados, especialmente en pollo. Los resultados obtenidos demuestran que los indicadores de tiempo-temperatura son una herramienta efectiva para monitorear la calidad sanitaria de los alimentos. Encontrando además que estos dispositivos se relacionan íntimamente con los resultados obtenidos en análisis microbiológicos para microorganismos patógenos y contaminantes que alteran la calidad, y resultaron más efectivos y precisos que el análisis sensorial o el análisis de metabolitos.

#### **2.1.4.3 Integración de sistemas**

Koutsoumanis *et al.*, (2001) desarrollaron el Sistema de Aseguramiento y Monitoreo Seguro (SMAS por sus siglas en inglés) basado en la evaluación del riesgo microbiológico en diferentes puntos de la cadena de frío para establecer el manejo del alimento en la siguiente etapa de distribución. Esta evaluación está basada en el historial de tiempo-temperatura del producto que se cuantifica por medio de TTI, las propiedades del alimento ( $pH, a_w$ ) y el uso de modelos predictivos de crecimiento de patógenos. Este enfoque permite asignar prioridad de venta a los productos con menor vida de anaquel residual y así maximizar la calidad del alimento que llega al consumidor. En el sistema SMAS, el historial de tiempo-temperatura de un producto es registrado por medio de TTI, los cuales se utilizan en diferentes puntos de la cadena de frío y generan información que se procesa utilizando métodos de la microbiología predictiva para establecer la vida de anaquel remanente del producto. Esta herramienta permite decidir si el producto debe ser distribuido a un mercado local, nacional o extranjero ya que esta decisión afecta el tiempo requerido para su distribución. El sistema también puede utilizarse para determinar cuáles productos deben comercializarse más rápido, o si fuera el caso, cuáles productos deben retirarse del mercado.

#### **2.1.4.4 Caracterizar la cadena de frío**

La realización de estudios de colaboración entre productores, transportistas y los supermercados para examinar la temperatura en los diferentes puntos de la cadena de frío es una muy buena opción, ya que los resultados obtenidos permiten conocer las variaciones de la temperatura a las que estarán sometidos sus productos y así el procesador pueda formular productos más estables y establecer fechas de caducidad que reflejen las condiciones reales de temperatura.

En estudios reportados por Simpson *et al.*, (1989) se encontró que en las estanterías de los supermercados encuestados en EUA, un 60-80% de los productos lácteos evaluados estaban fuera del rango de temperatura recomendado. La cadena de frío no termina cuando el producto se encuentra en el

punto de venta sino hasta que llega a manos del consumidor por lo que también es necesario tomar en cuenta el papel que juega el consumidor dentro de la cadena de frío. Un estudio realizado en el Reino Unido mostró que los consumidores tardan un promedio de 43min para llegar desde las tiendas de autoservicio hasta sus hogares, y otros 13min en colocar en el refrigerador alimentos refrigerados. Para medir el incremento de temperatura durante el transporte, se monitorearon una variedad de productos refrigerados durante una simulación de un viaje en coche por una hora, encontrando que algunos productos pueden alcanzar temperaturas cercanas a 30°C (James y James, 2002).

Estudios como los mencionados anteriormente han permitido establecer medidas efectivas para evitar o disminuir la alteración de la cadena de frío, como por ejemplo en los supermercados está la instalación de pasillos fríos, lo que permite disminuir el diferencial de temperatura entre los estantes refrigerados y el medio ambiente. También en algunos supermercados se venden bolsas aisladas térmicamente, las cuales mantienen baja la temperatura durante el transporte del alimento desde el supermercado hasta el hogar. Así como también en los supermercados existen políticas de recepción de alimentos refrigerados, rechazando o aceptándolos de acuerdo a la temperatura de entrega (Tirado *et. al.*, 2006).

## **2.2 Bacterias Lácticas**

Las bacterias lácticas de importancia en alimentos pertenecen a los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Stiles *et. al.*, 1997). Todas comparten la propiedad de producir ácido láctico como principal (heterofermentativas) ó único (homofermentativas) producto de su metabolismo.

### 2.2.1 Generalidades

Las bacterias lácticas morfológicamente se clasifican como gram positivas, no formadoras de esporas, son inmóviles o muy raramente móviles, presentan formas cocoides ó bacilares.

Fisiológicamente se caracterizan por producir mayoritariamente ácido láctico como producto final de la fermentación de los carbohidratos, no poseen citocromos y carecen de un sistema de transporte de electrones para generar ATP de manera aerobia, por tal motivo obtienen la energía sólo por fosforilación a nivel de sustrato, son catalasa negativas, crecen anaeróticamente, no obstante a diferencia de muchos anaerobios, la mayoría no son sensibles al O<sub>2</sub> y pueden crecer en su presencia como en ausencia del mismo, son quimiorganótrofas y tienen requerimientos nutricionales complejos.

Según sus requerimientos de temperatura pueden ser mesófilas, cuya temperatura óptima de crecimiento está entre los 26-32°C en este tipo de cultivos se encuentran las denominadas bacterias lácticas productoras de acidez: *Lactococcus lactis ssp. lactis* y *Lactococcus lactis ssp. cremoris* y las bacterias productoras de sabor: *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* y *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris*. Las primeras producen ácido láctico a partir de lactosa y las segundas diacetilo a partir de citrato. O bien, pueden ser termófilas, teniendo una temperatura óptima de crecimiento entre los 38-42°C, en este tipo de cultivos se han identificado las siguientes bacterias: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* y *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*.

Basándose en la utilización de la glucosa se les puede clasificar como homofermentativas, si producen ácido láctico como principal producto del metabolismo de glucosa usando la vía de Embden-Meyerhoff (glucólisis). Y existen las heterofermentativas, que además de producir ácido láctico a partir de la glucosa, producen también CO<sub>2</sub>, ácido acético y etanol en distintas cantidades, utilizando la vía de la hexosa monofosfato.

Los diversos géneros de bacterias lácticas se han definido a partir de su morfología celular y del tipo de metabolismo fermentativo, como se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4. Diferenciación de los principales géneros de las bacterias lácticas**  
(Brock *et. al.*, 1999)

<b>Género</b>	<b>Forma celular y organización</b>	<b>Fermentación</b>
<i>Streptococcus</i>	Cocos en cadena	Homofermentativa
<i>Leuconostoc</i>	Cocos en cadena	Heterofermentativa
<i>Lactobacillus</i>	Bacilos normalmente en cadena	Homofermentativa y algunas Heterofermentativa
<i>Lactococcus</i>	Cocos en cadena	Homofermentativa

De todo el grupo de bacterias lácticas, la cepa usada en esta investigación fue *Lactococcus lactis ssp. lactis* por lo que detallaremos mas sobre este género.

### **2.2.2 Lactococcus**

El género *Lactococcus* antiguamente pertenecía al género *Streptococcus*. Éste comprendía una amplia variedad de especies desde miembros que son patógenos para los humanos hasta los que desempeñan importantes funciones en los alimentos fermentados. Debido a diferencias filogenéticas (Stiles *et. al.*, 1997) y para distinguir los no patógenos de las especies patógenas, el género *Streptococcus* se dividió en tres géneros: *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* (Brock *et al.*, 1999).

El género *Lactococcus* constituye habitualmente la microbiota dominante de la leche, de la crema y de los quesos frescos. Aparte de sus características morfológicas los lactococos se distinguen por una acidificación más moderada de la leche (del 0.5% al 1% de ácido láctico) y por que tienen la mayor actividad reductora, la reducción del indicador se realiza antes que la coagulación, su temperatura de óptimo crecimiento está entre los 20 y 30°C, se desarrollan aún a

10°C, a veces a menos, pero no a 45°C, son sensibles a la sal y no poseen carácter patógeno (Alais, 1970).

Se conocen tres especies:

*Lactococcus lactis ssp. cremoris*. Este es más lábil y difícil de cultivar que los otros dos; depende estrechamente de la leche, ya que no puede utilizar otros glúcidos más que la lactosa y sus dos componentes. Es muy sensible a agentes químicos, como la sal; suele presentarse en la leche bajo la forma de largas cadenas; es la causante de la viscosidad de la leche.

*Lactococcus lactis ssp. lactis*. Está dotado de las propiedades que le faltan al *L. lactis ssp. cremoris*; fermenta varios glúcidos, se reproduce en presencia de 4% de NaCl, hidroliza la arginina y presenta un sistema enzimático que degrada la caseína. Se encuentra en forma de diplococos y esta más difundido que el anterior.

*Lactococcus lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis*. Es parecido al anterior y se caracteriza por la producción de acetoina a partir de los citratos.

### **2.2.3 Metabolismo de lactosa**

La importancia de las bacterias lácticas a nivel comercial se debe en gran medida a la capacidad de convertir la lactosa y otros azúcares en ácido láctico.

Recordemos que las bacterias lácticas carecen de un sistema de transporte de electrones para generar ATP de manera aerobia. Esto significa que dependen de mecanismos anaerobios para generar energía, de esta forma, estas bacterias metabolizan los azúcares a ácido láctico y otros compuestos ya que en este proceso se genera ATP en completa ausencia de oxígeno. La vía por la que el género *Lactococcus* realiza el metabolismo de la lactosa es la ruta del homolactato (Figura 1).

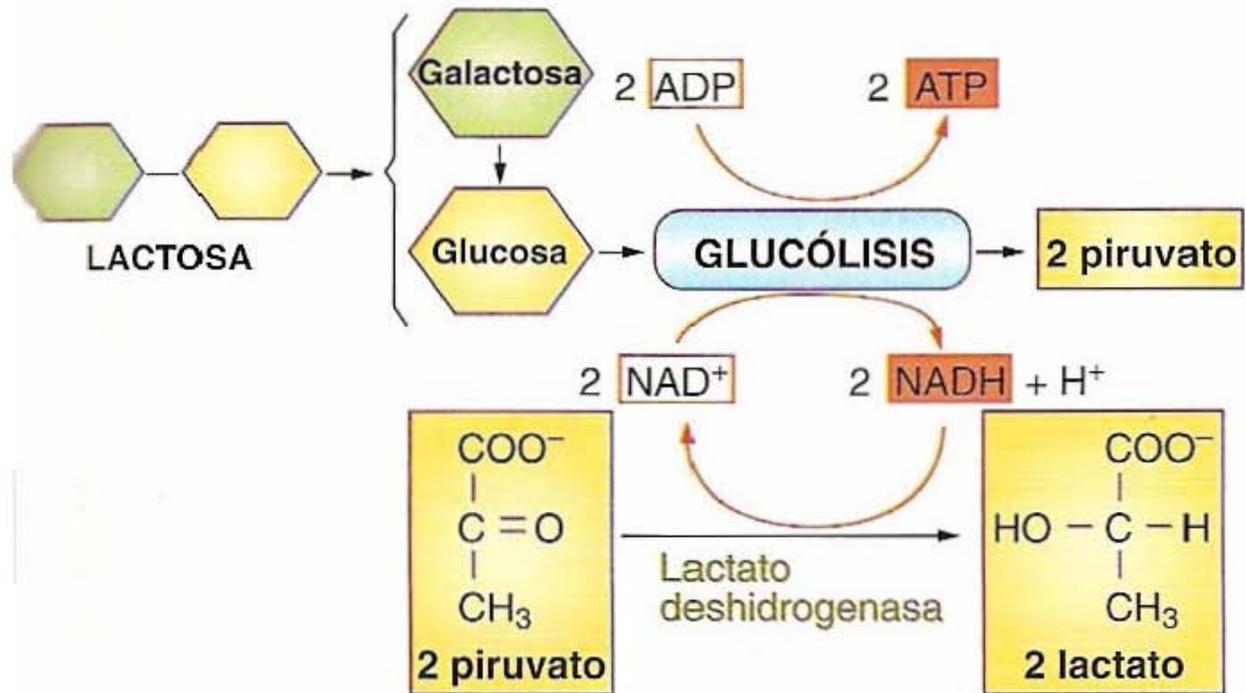


Figura 1. Ruta homofermentativa de utilización de lactosa en las bacterias lácticas

### 2.2.3.1 Transporte e Hidrólisis de Lactosa.

Se sabe que la lactosa entra a la célula por medio del Sistema Fosfo Transferasa – Fosfo Enol Piruvato (SFT-FEP). En este mecanismo la molécula de azúcar es fosforilada durante su paso a través de la membrana citoplasmática y la fuente inicial de fosfato es el intermediario de la glucólisis conocido como fosfo enol piruvato (FEP).

### 2.2.3.2 Conversión de hexosa a triosa fosfato.

Posteriormente a su transporte e hidrólisis, la enzima fosfo-β-galactosidasa (fβgal) hidroliza la lactosa fosfato a glucosa y galactosa-6-fosfato. La galactosa-6-fosfato es metabolizada por la ruta de la tagatosa formando Gliceraldehído-3 fosfato y Dihidroxiacetona-fosfato, estos compuestos también se forman en la ruta de Embden-Meyerhoff, pero las enzimas involucradas son específicas para los intermediarios generados en esta ruta.

La glucosa es fosforilada por ATP dando glucosa-6-fosfato. La fosforilación inicial de la glucosa activa la molécula para las subsiguientes reacciones. La Glucosa-6-fosfato es convertida en una forma isomérica, la fructosa-6-fosfato y una fosforilación adicional la convierte en fructosa 1,6-difosfato, que es el metabolito intermediario clave de la glucólisis. La enzima aldolasa cataliza la ruptura de la fructosa 1,6-difosfato en dos moléculas de tres carbonos, el Gliceraldehído-3-fosfato y su isómero Dihidroxiacetona fosfato.

#### **2.2.3.3 Conversión de triosa fosfato a piruvato.**

La secuencia inicia con una compleja reacción catalizada por la triosa fosfato deshidrogenasa en donde se oxida un aldehído para formar ácido y se forma un enlace de alta energía. Los electrones (y protones) removidos en la oxidación son transferidos a  $\text{NAD}^+$ . En el siguiente paso, la desfosforilación del 1,3-difosfoglicerato está acoplada a la fosforilación de ADP para formar ATP. Posteriormente dos reacciones más dan origen al fosfoenolpiruvato. Este intermediario con enlace de alta energía es desfosforilado a piruvato en una reacción acoplada a la síntesis de ATP a partir de ADP.

#### **2.2.3.4 Conversión de piruvato a lactato.**

El metabolismo de azúcares hacia piruvato causa un desequilibrio en el estado de óxido-reducción de la célula reflejado en su balance de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . La reacción de la triosa fosfato deshidrogenasa requiere  $\text{NAD}^+$  y puede cesar rápidamente a menos que el  $\text{NADH}$  producido se reoxide. Las bacterias lácticas regeneran el  $\text{NAD}^+$  reduciendo el piruvato a lactato por medio de la lactato deshidrogenasa (Sigala, 2000).

#### **2.2.4 Uso de las Bacterias Lácticas en los alimentos**

Las bacterias ácido lácticas forman parte de la microbiota inicial de muchos alimentos, no existe ninguna indicación de que representen un riesgo para la salud del consumidor y son consideradas como GRAS (reconocidas generalmente como seguras) por la Food Drug Administration de EEUU.

Además, se sabe que pueden tener un efecto positivo en la salud del consumidor. Algunas bacterias se han relacionado con la regulación del tracto intestinal (Gilliland, 1990).

Las bacterias lácticas son usadas primordialmente para la elaboración de alimentos fermentados. Desde la antigüedad la fermentación de alimentos se ha usado como un método de conservación, se producía por el crecimiento natural de los microorganismos y se ha desarrollado en todo tipo de alimentos: vegetales, carnes y lácteos. Actualmente los microorganismos son adicionados deliberadamente a los alimentos, a fin de asegurar la calidad del producto final.

Las principales modificaciones del alimento, debido a la actividad microbiana, se dan sobre la textura, sabor y aroma, pero presentan también otras variaciones. De hecho la fermentación puede afectar la calidad nutricional del producto, modificando los niveles de aminoácidos y vitaminas. Así mismo la actividad microbiana es importante para la destrucción o disminución de los microorganismos indeseables, que es un factor crucial en la preservación del alimento.

En la tabla 5 se encuentran agrupados los principales agentes de la fermentación de distintos tipos de alimentos. Como se observa en esta tabla, las bacterias lácticas intervienen en la fermentación de todo tipo de alimento.

**Tabla 5. Bacterias lácticas importantes en la fermentación de alimentos (Hernández, 1992; Prescott, 2004).**

PRODUCTO	BACTERIA
LACTEOS	<i>Lactococcus lactis</i> subespecies: <i>lactis</i> , <i>cremoris</i> y <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> ; <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> ; <i>Lactobacillus delbrueki</i> subespecies: <i>bulgaricus</i> y <i>leichmannii</i> ; <i>Lactobacillus brevis</i> y <i>helveticus</i> ; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subespecies: <i>cremoris</i> , <i>mesenteroides</i> y <i>lactis</i> .
CARNICOS	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Pediococcus</i> sp.
VEGETALES	<i>Lactobacillus</i> sp. <i>Leuconostoc</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp. <i>Pediococcus</i> sp.

PANES ESPECIALES	<i>Lactobacillus sp.</i>
BEBIDAS ALCOHÓLICAS DESTILADAS	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>

El ácido láctico producido durante el metabolismo de las bacterias lácticas provoca un descenso de pH que favorece tanto la conservación de los alimentos como un cambio en la textura, debido a la desnaturalización de las proteínas. Además contribuye a las características de sabor de los alimentos fermentados.

Si bien, las bacterias lácticas están implicadas en la elaboración de gran diversidad de productos, su mayor impacto recae sobre la industria láctea. En la tabla 6 se enlistan las bacterias lácticas más comúnmente utilizadas en la elaboración de productos lácteos.

**Tabla 6. Bacterias usadas en la elaboración de productos lácteos**

ESPECIE	PRODUCTOS EN LOS QUE SE USA	FUNCIONES
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis.</i>	Quesos cocinados a temperaturas moderadas, jocoque, leches escandinavas, crema ácida, queso cottage	Producción de ácido láctico
<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>	Quesos cocinados a temperaturas moderadas, jocoque, leches escandinavas, crema ácida, queso cottage	Producción de ácido láctico
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis</i>	Quesos cocinados a temperaturas moderadas, queso cottage, crema ácida, mantequilla	Producción de ácido láctico y diacetilo que da aroma y sabor
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Quesos cocinados a temperaturas altas, yogurt, labne, dahi	Producción de ácido láctico y diacetilo que da aroma y sabor
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	Quesos cocinados a temperaturas altas, yogurt, labne, dahi, leche bulgara	Producción de ácido láctico y diacetilo que da aroma y sabor
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp.</i>	Quesos cocinados a temperaturas altas	Producción de ácido láctico y diacetilo que da aroma y sabor

<i>lactis</i>		
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Quesos cocinados a temperaturas altas	Producción de ácido láctico y diacetilo que da aroma y sabor
<i>Lactobacillus casei ssp. casei</i>	Yakult y otras leches fermentadas	Producción de ácido láctico y diacetilo que da aroma y sabor. Probiótico
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leche acidófila, yogurt acidófilo, bioghurt y otras leches fermentadas	Probiótico
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris</i>	Quesos cocinados a temperaturas moderadas, jocoque, leches escandinavas, crema ácida, queso cottage, mantequilla	Producción de aroma y sabor por la producción de diacetilo
<i>Leuconostoc lactis</i>	Quesos cocinados a temperaturas moderadas, jocoque, leches escandinavas, crema ácida, queso cottage, mantequilla	Producción de aroma y sabor por la producción de diacetilo

## 2.3 Indicadores Redox

Un indicador Redox es una sustancia que cambia de color cuando pasa de su forma oxidada a su forma reducida. Cabe mencionar que existen muchos indicadores redox, dado que en esta investigación sólo se trabajó con la resazurina la describiremos con mayor detalle.

### 2.3.1 Características de la Resazurina

En 1929 la resazurina fue introducida en Alemania por Pesch y Simmert, como sustituto del azul de metileno, para pruebas de reducción en leche. La resazurina es más electropositiva y más sensible que el azul de metileno para detectar cambios en el potencial de óxido-reducción de la leche.

La resazurina es una oxazona, que imparte color azul a la leche. Se reduce en dos etapas: en la primera (de manera irreversible) en su correspondiente oxazina, pasando por diversas tonalidades de violeta hasta rojo-rosa por la formación de un compuesto llamado resorufina, la reducción pasa a una segunda etapa reversible, en la cual la resorufina se reduce a dehidrorresufina, compuesto

incolore que por oxidación puede pasar nuevamente a resorufina (rojo-rosa)  
Figura 2.

**Figura 2. Reacción de la Resazurina**



En la primera etapa, el viraje tiene lugar con un potencial redox de +0.2 a +0.05 voltios, y en la segunda etapa de +0.15 a 0 voltios (Reyes, 1988).

### 2.3.2 Usos de resazurina

Dado que la reducción de la resazurina es caracterizada por los cambios de color y porque el compuesto intermediario en la reacción (resorufina) es un fuerte emisor de fluorescencia, cambios mínimos en la concentración de resazurina pueden ser detectados por métodos colorimétricos o fluorométricos, esta característica química hace que la resazurina tenga una amplia variedad de usos.

Tradicionalmente es usada en las pruebas de reducción, dentro de las técnicas rutinarias de control para evaluar la calidad microbiológica de la leche. Las pruebas de reducción son un método indirecto para determinar el número de microorganismos presentes en la leche ya que únicamente se observa con qué rapidez e intensidad se dan las modificaciones cromáticas del colorante añadido a la leche por la actividad de los microorganismos. La prueba de la reducción nos ayuda a conocer el estado de frescura de la leche y su estabilidad frente a las bacterias acidificantes. (Demeter *et al.* 1971; Lerche M. 1969).

Mallikarjuna y Karunasagar (1990) plantearon la utilización de la prueba de reducción de resazurina, en la estimación de la calidad microbiológica de pescado y productos marinos y encontraron que su uso es factible ya que resulta

ser una prueba rápida y simple que no requiere de muchos instrumentos o de personal altamente capacitado.

Este colorante también ha sido usado con éxito en evaluaciones para determinar la capacidad de fertilidad en seres humanos (Glass *et al.*, 1991), toros (Erb and Ehlers, 1950, 1952; Dart *et al.*, 1994), cerdos y más recientemente con sementales. La actividad metabólica del espermatozoide reduce la resazurina (color azul) a resorufina (color rosa) y posteriormente a dihidroresorufina (incoloro), el tiempo de reducción es asociado con la concentración de espermatozoides viables (Dart *et al.*, 1994).

### **2.3.2.1 Equipo para determinar la calidad microbiológica de la leche**

Como se menciona anteriormente el principal uso de la resazurina está dentro de los métodos de reducción de colorantes para determinar la calidad microbiológica de la leche.

El fundamento de estas pruebas es la relación que existe entre el desarrollo microbiano y el descenso del potencial redox de la leche. La leche fresca normal tiene un potencial redox (Eh) comprendido entre +0.20 y +0.30 volt. Dentro de los factores que intervienen en las propiedades óxido-reductoras de la leche están: (Alais, 1970)

1. El oxígeno disuelto es responsable, en gran parte, del Eh positivo de la leche fresca cruda.
2. Las bacterias que proliferan en la leche, tienen una actividad reductora como consecuencias de dos fenómenos:
  - a) desaparición del oxígeno disuelto a causa de la respiración lo que provoca un descenso del Eh
  - b) producción de un sistema reductor propio de las bacterias.

Es este último factor por el cual la determinación del potencial redox es de gran interés. El potencial redox sólo se determina en los laboratorios de investigación; es una operación bastante delicada, que precisa eliminar la influencia del oxígeno del aire. En la práctica se llevan a cabo dos pruebas donde se utilizan indicadores químicos como el azul de metileno o la resazurina.

Según la teoría de Wieland, los métodos de transformación se basan en la reducción de las sustancias agregadas (colorante químico) y los receptores naturales presentes; los cuales resultan reducidos por el hidrógeno de la deshidrogenación, cuya transferencia cuantitativa del colorante depende de las bacterias presentes (Demeter, 1969).

Por lo tanto en ambas pruebas la reducción del colorante es causada por la actividad de los microorganismos, pues consumen el oxígeno disuelto, a la vez que se generan sustancias reductoras. Cuantas más bacterias haya en la leche, más rápidamente se realiza el cambio de color. Sin embargo la situación no es tan sencilla, ya que no todas las bacterias son reductoras con la misma intensidad, por ejemplo, los estreptococos lácticos comunes (*Lactococcus lactis*) y también las bacterias coliformes (género *Escherichia*) son los más reductores (Demeter *et al.*, 1971; Lerche, 1969).

En el laboratorio del Dr. Pérez-Gavilán se diseñó un Kit de resazurina para el control microbiológico de la leche fluida (Pérez-Gavilán, 1993) con el objetivo de reemplazar el método de reducción de la resazurina normal y brindar una alternativa diferente, práctica, sencilla y confiable para la evaluación semi-cuantitativa de la calidad microbiológica de la leche.

Dicho Kit consiste en un recipiente de un material transparente con capacidad de 8ml, el cual contiene una solución de resazurina ya seca y un tapón para el recipiente. La manera de emplearlo es la siguiente:

1. Colocar en el equipo 5ml de la leche problema (llenar hasta la marca)
2. Tapar perfectamente bien, con el tapón que se incluye en el equipo.
3. Invertir el equipo 5 veces para incorporar la leche con el colorante.
4. Guardar el equipo en una bolsa de la ropa, próxima al cuerpo de una persona para que adquiera su temperatura (37°C)
5. Registrar el vire o cambio de color, al término de un periodo de 3 horas.

El cambio de la coloración se interpreta de una manera sencilla.

Color azul o violeta = calidad aceptable.

Color rosa o blanco = calidad inaceptable

Como las diversas clases de microorganismos influyen de manera muy distinta sobre el potencial redox, las pruebas de reducción no permiten sacar ninguna conclusión exacta sobre el contenido microbiano, solo se puede hacer una relación aproximada entre la tasa microbiana y el tiempo de reducción.

Este Kit presenta ciertas ventajas sobre otros métodos de control de calidad puesto que: no requiere de personal especializado, no requiere de un laboratorio especial para el análisis de alimentos, no requiere de material ni equipo costoso, la temperatura de incubación (37°C) se puede alcanzar con la temperatura del cuerpo humano y es desechable el material empleado.

## 3.- OBJETIVOS

### 3.1.- Objetivo General

- Desarrollar un kit a base de bacterias lácticas y resazurina para verificar la cadena de frío de los productos perecederos.

### 3.2.- Objetivos Específicos

- Desarrollar la curva de crecimiento de *Lactococcus lactis ssp. lactis* hasta la fase estacionaria.
- Establecer la cantidad de bacterias con la cual no se observe un vire de la resazurina a una temperatura de 4°C por largo tiempo pero si se observe a temperatura ambiente.
- Proponer la presentación del kit, considerando la viabilidad, su manera de uso y el manejo.

## 4.- MATERIALES Y METODOS

### 4.1 Microorganismos

Se empleó la cepa *Lactococcus lactis ssp. lactis* BM147 perteneciente a la colección del cepario del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Dicha cepa se mantuvo a -78°C en solución de leche descremada con  $\beta$ -glicerol fosfato de sodio.

### 4.2 Medios de cultivo utilizados

#### 4.2.1 Leche descremada al 11% de sólidos totales (ST)

Se disuelve en agua destilada la leche descremada en polvo, se agita durante 15 minutos y se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 minutos.

#### 4.2.2 Agar APT (DIFCO LABORATORIES) para Cuenta en placa

Su composición en gramos por litro es la siguiente:

Componente	g/l
Agar bacteriológico	14
Peptona de caseína	12.5
Extracto de levadura	7.5
D-(+) Glucosa	10
Cloruro de sodio	5
Tricitrato sódico	5
Fosfato de potasio dibásico	5
Tween 80	0.2
Sulfato de magnesio	0.8
Cloruro de magnesio	0.14
Sulfato ferroso	0.04

El medio debe tener un pH de 6.8 +/- 0.1 y se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 minutos.

#### 4.2.3 Medio Industrial para curva de crecimiento

Este medio de cultivo fue el propuesto por Goldhaber (1982). Elaborado con materias primas de grado industrial disueltas en agua destilada.

Su composición en gramos por litro es la siguiente:

Componente	g/l
Leche descremada en polvo	60
Glucosa	25
Extracto de levadura	10
Caseinato de sodio	20

El medio debe tener un pH de 7.2 +/- 0.1 y se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 minutos.

#### 4.2.4 Medio 1 como medio de dilución

Con base en los estudios realizados por Goldhaber (1982) se seleccionó un medio de cultivo para la producción de *L. lácticas* cuya coloración no interviniera con las tonalidades de la reducción de la resazurina. Su composición en gramos por litro es la siguiente:

Componente	g/l
Lactosa	25
Glucosa	25
Caseinato de sodio	10

El medio debe tener un pH de 7.2 +/- 0.1. Por cuestiones de experimentación este medio no se esteriliza.

### 4.3 Metodología

En la figura 3 se observan los pasos que se siguieron para llegar al desarrollo del Kit.

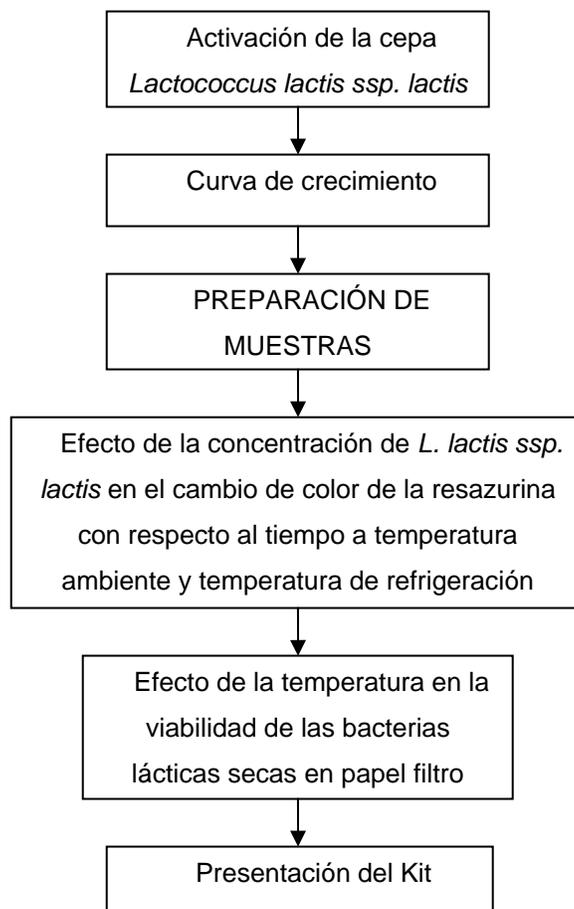


Figura 3. Metodología para el desarrollo del Kit

#### 4.3.1 Activación de la cepa *Lactococcus lactis ssp. lactis*

Los microorganismos congelados se reactivaron de acuerdo con la metodología propuesta por Goldhaber (1982). Como se detalla en el cuadro 1.

<b>Cuadro 1. Metodología para la reactivación de la cepa</b>	
Medio de cultivo	Leche descremada al 11% de ST
Volumen inoculado	1% (v/v)
Temperatura incubación	29°C

---

Siembra inicial	24h de incubación
1 <sup>a</sup> resiembra	18-24h de incubación
2 <sup>a</sup> resiembra	18h de incubación
3 <sup>a</sup> resiembra	12h de incubación

---

#### **4.3.2 Curva de crecimiento**

Los inóculos se prepararon a partir de la tercera resiembra, inoculando al 1% (v/v) 100ml de medio industrial. Este paso se realizó por triplicado. Se incubaron a temperatura ambiente, cada 2 horas durante las primeras 10 horas se realizaron diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-9}$ , la última toma se hizo a las 24 horas. Se tomó 1ml de cada una de las diluciones y se sembraron en agar APT estéril, dichas siembras se incubaron a 29°C, hasta la aparición de colonias macroscópicas (24-48h). Estas colonias se cuentan, se saca un promedio y el valor obtenido se multiplica por el inverso de la dilución efectuada, obteniéndose así, la población microbiana viable/ml presente a los distintos tiempos de crecimiento.

#### **4.3.3 Efecto de la concentración de *Lactococcus lactis spp. lactis* en el cambio de color de la resazurina con respecto al tiempo a temperatura ambiente y temperatura de refrigeración.**

Para la determinación de la concentración de bacterias lácticas, se partió de un cultivo de *L. lactis ssp lactis* en medio industrial con 18-24 horas de incubación a 29°C (fase estacionaria), se realizaron diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  en medio 1 y con cada una de ellas se impregnaron por triplicado tiras de papel filtro (Whatman No. 4 de 4cm x 2cm). Posteriormente estas tiras se secan al vacío en un desecador a temperatura ambiente durante 30 minutos, con una presión de 15 a 25mm Hg. Una vez secas, con una tira de cada dilución se hace cuenta en placa en agar APT y las otras dos se monitorean con resazurina para observar los cambios de coloración.

De igual manera la resazurina fue impregnada en tiras de papel filtro (Whatman No. 4 de 4cm x 2cm) sumergiéndolas en 1ml de solución de resazurina

(0.0125mg/25ml) y se sometieron a un secado al vacío en un desecador a temperatura ambiente por 30 minutos.

Las tiras de papel filtro impregnadas con *L. lactis ssp. lactis* junto con las tiras de papel filtro impregnadas con resazurina se humedecieron con 0.5ml de agua y se colocaron dentro de una bolsa de polietileno que posteriormente fue sellada herméticamente.

Se manejaron dos condiciones de almacenamiento una a temperatura de refrigeración (4°C) y otra a temperatura de 29°C.

De ambas muestras se fue registrando el cambio de color de la resazurina contenida en las tiras de papel filtro, iniciando por el azul, violeta y rosa hasta llegar a la decoloración total de la resazurina (color blanco).

Para las muestras almacenadas a temperatura de refrigeración (4°C) el registro de color se hizo cada hora durante el primer día y posteriormente cada 24 horas. Y para las muestras almacenadas a 29°C el registro fue cada hora.

#### **4.3.4 Efecto de la temperatura en la viabilidad de las Bacterias Lácticas secadas en papel filtro.**

Se prepararon mas muestras con la concentración de bacterias a usar ( $1 \times 10^5$  UFC/ml). Las tiras de papel filtro impregnadas con *L. lactis ssp lactis* y secadas al vacío en un desecador a temperatura ambiente por 30 minutos se colocaron dentro de una bolsa de polietileno que posteriormente fue sellada.

Se evaluaron dos condiciones de almacenamiento para la vida de anaquel, una a 4°C y otra a temperatura ambiente (20-25°C). Cada semana se hizo cuenta de microorganismos viables a las tiras de papel impregnadas con las bacterias lácticas por un periodo de 10 semanas.

##### **4.3.4.1 Cuenta de microorganismos viables**

Esta determinación se hizo por el método de vaciado en placa en agar APT, a partir de diluciones decimales en agua peptonada al 0.1%. Las cajas petri fueron incubadas a 29°C por 48 horas y el conteo se expresó en UFC/ml (unidades formadores de colonia por mililitro)

#### **4.3.5 Presentación del Kit**

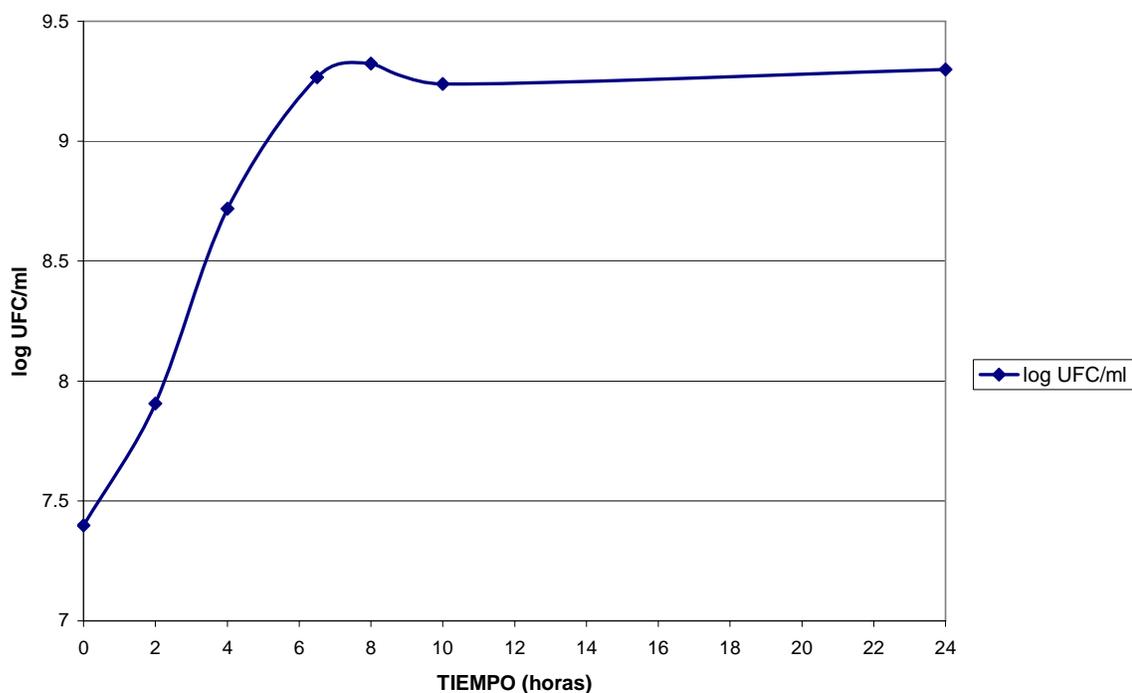
El kit consiste en dos tiras de papel filtro (Whatman No 4 de 4cm x 2cm) una impregnada con *Lactococcus lactis ssp. lactis* cosechadas en fase estacionaria y crecidas en un medio que no interviniera con las tonalidades de la reducción del colorante (Medio 1) y la otra tira impregnada con resazurina. Después de impregnadas las dos tiras de papel son secadas al vacío en un desecador a temperatura ambiente durante 30min. Una vez secas se colocan dentro de una bolsa de polietileno junto con una bolsa de menor tamaño que contiene 0.5ml de agua, se cierra de manera hermética y se mantiene en refrigeración hasta ser activada.

Para su activación se presiona la bolsa con agua hasta romperla, de manera que las tiras de papel se impregnen con el líquido y la reacción de la resazurina se lleve a cabo.

## 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Curva de crecimiento

En la gráfica 1 se presenta el crecimiento de *Lactococcus lactis ssp. lactis*, en la que se observa que se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento después de las seis horas de cultivo, presentando una población máxima de  $1 \times 10^9$  UFC/ml. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Hernández (1992), para la misma cepa crecida en el medio de cultivo industrial.



Gráfica 1. Cinética de crecimiento de *Lactococcus lactis ssp. lactis* incubada en Medio Industrial a 29°C

Goldhaber (1982) y Sigala (2000) trabajaron con cultivos de bacterias lácticas en fase estacionaria de crecimiento y en fase exponencial respectivamente y observaron que la sobrevivencia durante el almacenamiento en refrigeración es independiente de la fase que provengan las células, lo importante es que exista un control de pH. En este trabajo partimos de la fase estacionaria de crecimiento de *L. lactis ssp. lactis* pues es en esta fase donde la bacteria alcanza su máximo crecimiento y permanece estable por un tiempo lo que facilitó

experimentar con varias diluciones y encontrar la concentración de bacterias que más se acercara al objetivo.

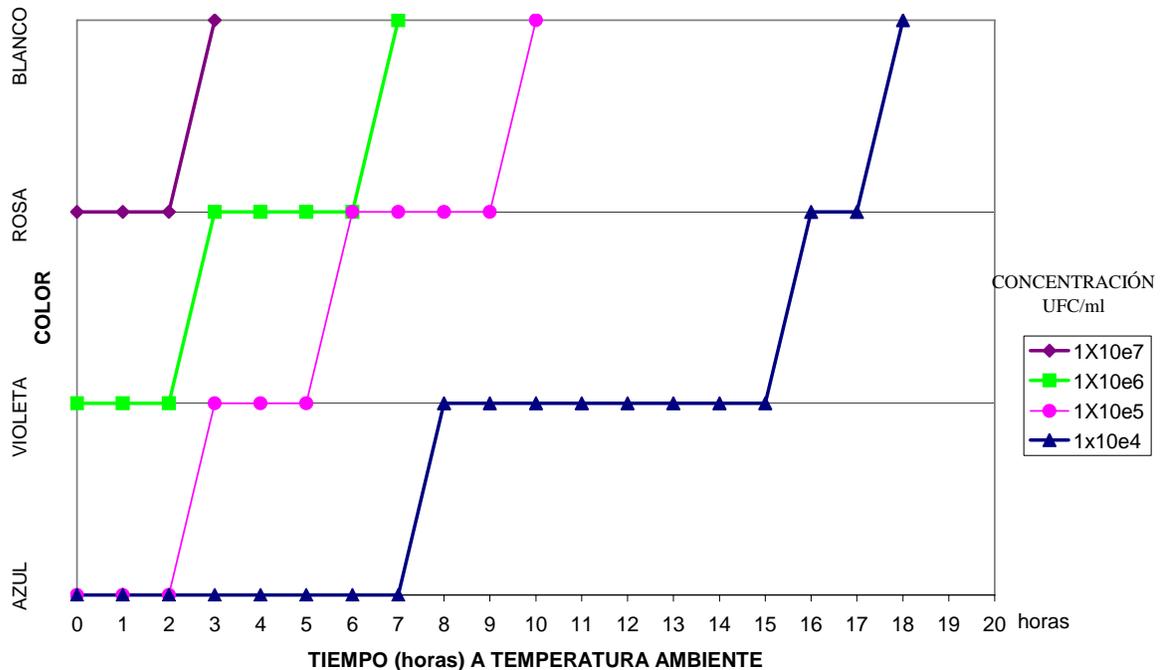
## **5.2 Efecto de la concentración de *Lactococcus lactis spp. lactis* en el cambio de color de la resazurina con respecto al tiempo a temperatura ambiente y temperatura de refrigeración.**

En la primera etapa de la reducción de la resazurina se pasa por tonalidades violetas hasta llegar a la formación de resorufina que se manifiesta por la coloración rosa, como se puede ver en la figura 4. Debido a que en la propuesta de Kit se logran identificar estas tonalidades violetas, también se tomaron en cuenta para graficar los resultados obtenidos.



**Figura 4. Virajes de coloración de la Resazurina a diferentes concentraciones de *L. lactis ssp. lactis***

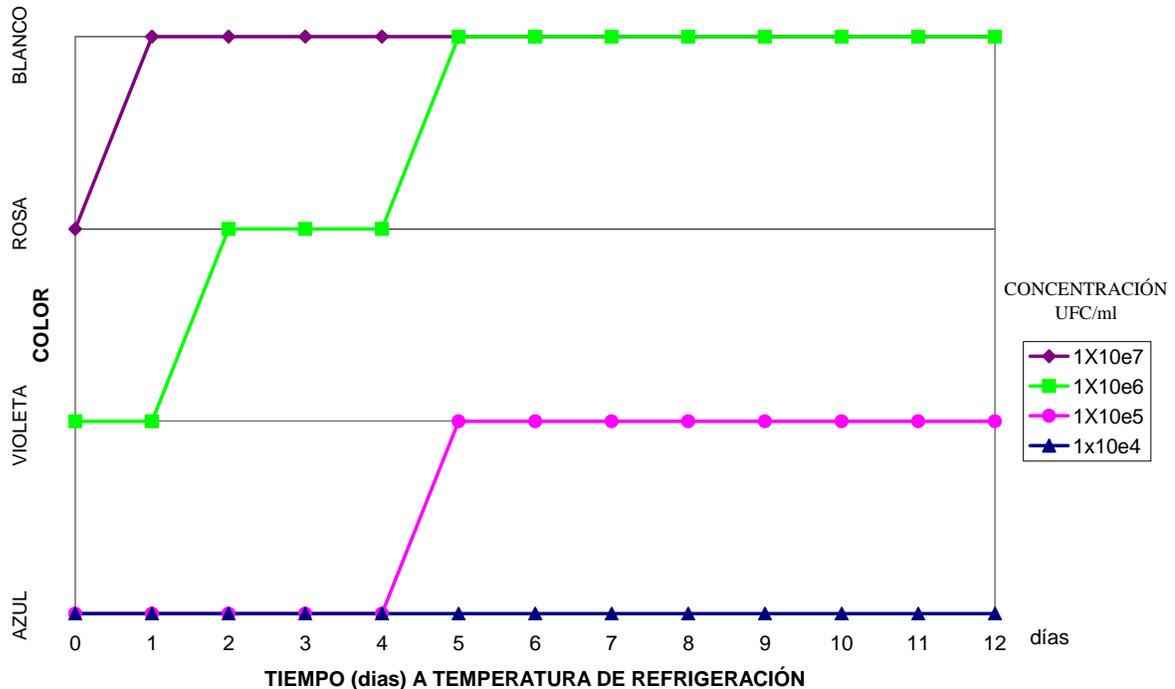
En la gráfica 2 se muestran los cambios de color que presentó la resazurina en los kit's mantenidos a temperatura ambiente con diferentes concentraciones de *L. lactis ssp. lactis* en el medio 1.



**Gráfica 2. Seguimiento de la decoloración de la Resazurina a temperatura ambiente con diferentes concentraciones de *L. lactis ssp. lactis***

Se observa que con concentraciones bajas ( $1 \times 10^4$  UFC/ml) el cambio de color ocurre en un tiempo muy largo, requiriendo de 8hrs para que de el primer cambio a violeta y de 16hrs para que de el siguiente cambio a rosa. Esto no permite detectar rápidamente una alteración en la refrigeración, ya que este periodo de tiempo es suficiente para que el alimento monitoreado se pueda alterar sin que se registre ningún cambio mediato en el kit. Por el contrario, concentraciones muy altas realizan el cambio de color muy rápido, como en el caso de una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/ml el color de la resazurina se vuelve rosa de manera inmediata, aun cuando se mantiene en refrigeración como se observa en la gráfica 3 y esto tampoco permite saber si se alteró o no la cadena de frío.

Los resultados obtenidos en los cambios de color de la resazurina a temperatura ambiente con diferentes concentraciones de bacterias lácticas (gráfica 2) concuerdan con la interpretación que se le da a los resultados obtenidos por el equipo para determinar la calidad microbiológica de la leche (Patente 170279, UNAM).



**Gráfica 3. Seguimiento de la decoloración de la Resazurina en refrigeración con diferentes concentraciones de *L. lactis ssp. lactis***

En las respectivas gráficas se muestra como el tiempo que debe transcurrir para que ocurra el vire de la resazurina al rosa es menor mientras mayor es el número de UFC presentes en las tiras de papel filtro. En el Kit la velocidad a la cual se lleva a cabo el vire del color se halla en función de la cantidad de *L. lactis ssp. lactis* presente y de su velocidad de desarrollo y metabolismo a diversas temperaturas: temperatura ambiente y temperatura de refrigeración.

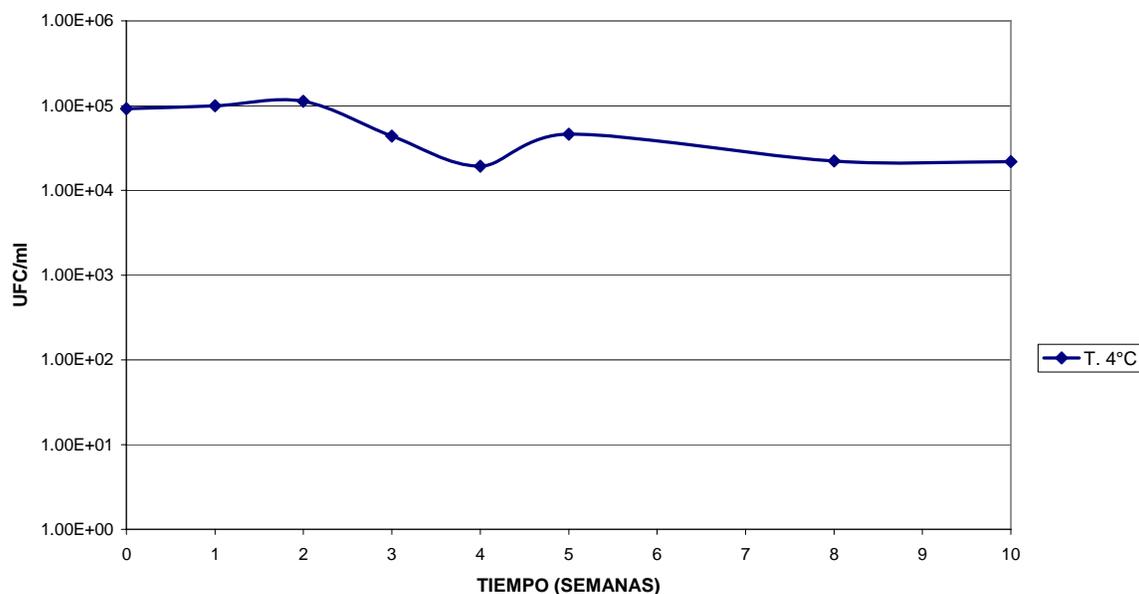
La finalidad de ir modificando la concentración de las bacterias lácticas fue encontrar una que a temperatura de refrigeración (4°C) mantenga el color de la resazurina azul por un periodo largo, pues el crecimiento de *L. lactis ssp. lactis* a temperaturas menores a 10°C es muy lento o se inhibe (Alais, 1970) y se requiere de un mayor tiempo para que la cuenta microbiana pueda tener un potencial de reducción suficiente para originar la decoloración de la resazurina; pero que al mismo tiempo esa concentración de bacterias lácticas a temperatura ambiente causen un cambio en la coloración de la resazurina lo más pronto posible dado que se encuentran en su temperatura óptima de crecimiento y son las bacterias lácticas del género *Lactococcus* las que poseen una intensa fuerza reductora.

La concentración de bacterias más adecuada para el kit fue de  $1 \times 10^5$  UFC/ml (gráfica 2) debido a que a temperatura ambiente generan el cambio de color de la resazurina en dos horas (pasa de azul a violeta) y a  $4^\circ\text{C}$  dura cinco días con una coloración azul-violeta (gráfica 3).

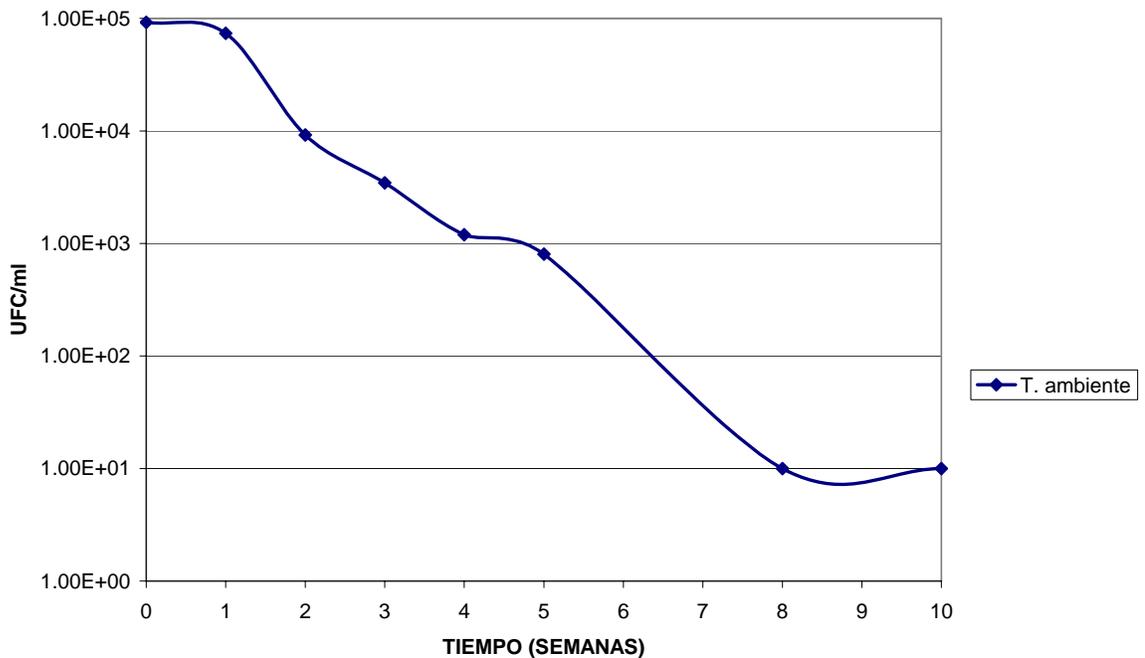
El cambio de color de la resazurina de azul a rosa en el kit, nos indicará que la cadena de frío se ha alterado; como la reacción en esta etapa no es reversible el kit se mantendrá así a pesar de que se vuelva a refrigerar dándonos con esto la seguridad de que los resultados arrojados por el kit no se pueden alterar, haciéndolos entonces más confiables.

### 5.3 Efecto de la temperatura en la viabilidad de las Bacterias Lácticas secadas en papel filtro.

En las gráficas 4 y 5 se evalúa la viabilidad del kit en función de la cantidad de bacterias lácticas que se conservan vivas después del proceso de secado al vacío y de almacenarse a  $4^\circ\text{C}$  y a temperatura ambiente respectivamente.



Gráfica 4. Viabilidad de las Bacterias Lácticas secadas en papel filtro almacenadas en refrigeración ( $4^\circ\text{C}$ )



**Gráfica 5. Viabilidad de las Bacterias Lácticas secadas en papel filtro almacenadas a temperatura ambiente**

Se observa una tendencia a la disminución de bacterias lácticas a ambas temperaturas de almacenamiento. Esta disminución fue mucho más significativa en las muestras mantenidas a temperatura ambiente. Después de dos semanas hay una fuerte disminución en la población de bacterias lácticas, esto puede deberse a que las bacterias se encuentran a su temperatura óptima de crecimiento, con los nutrientes necesarios, pero si no se seca perfectamente el papel filtro, la  $a_w$  aumenta y las bacterias tienen los recursos necesarios para seguir vivas, crecer y producir ácido hasta que inevitablemente van muriendo. Como se ve en la gráfica 5 donde conforme pasa el tiempo hay un descenso en la concentración inicial de bacterias, que para el fin del presente trabajo, ya no permite trabajar con concentraciones de ese orden.

La que mejor comportamiento presentó fue la almacenada a 4°C ya que por un periodo mayor a cinco semanas las bacterias lácticas se siguen conservando, con ligeros cambios en su concentración inicial, pero que aun así permite llevar a cabo el objetivo sin que afecte el funcionamiento del kit.

Cabe resaltar que este método de conservación de bacterias es una propuesta que se hace dentro de esta investigación y cumple con los objetivos, permitiendo tener de manera práctica, rápida y económica bacterias lácticas conservadas en papel filtro, siendo pues una alternativa más a los métodos tradicionalmente usados en la industria láctea como los liofilizados y congelados.

#### 5.4 Presentación del Kit

En la figura 5 se muestra el diseño del kit de monitoreo de la cadena de frío. La activación de este consiste en presionar la bolsa de agua hasta romperla, de esta manera se mojan las tiras de papel, lo que activa a las bacterias y por lo tanto ocurre la reacción entre ellas y la resazurina.

La velocidad de decoloración que presente la resazurina dependerá de la temperatura de exposición. Entonces, si las tiras de papel han cambiado de color indica que el alimento sufrió alteraciones durante la cadena de frío.



Figura 5. Diseño del Kit de Monitoreo de la cadena de frío

#### 5.5 Método para el uso del Kit de Monitoreo de la Cadena de Frío

1. Con los dedos ejercer presión sobre la bolsa con agua hasta sacar el líquido.

2. Impregnar de manera homogénea las tiras de papel filtro con este líquido.
3. Colocarlo sobre el alimento o producto a monitorear.
4. Registrar el vire o cambio de color que presenta el kit, al final del transporte o almacenamiento en frío del alimento.

**Interpretación de la lectura del vire de color en el Kit de Monitoreo de la Cadena de Frío**

<b>Color del vire</b>	<b>Interpretación</b>
Azul	El producto fue manejado en buenas condiciones
Violeta	El producto sufrió alteraciones en su cadena de frío por un periodo de tiempo de 2 horas
Rosa	El producto sufrió alteraciones en su cadena de frío por un periodo de tiempo de 6 horas
Blanco	El producto sufrió alteraciones en su cadena de frío por periodos largos de tiempo

**5.6 Comparación del método de bacterias lácticas y resazurina con otros métodos utilizados.**

En la actualidad existen varios sistemas indicadores de tiempo-temperatura, el mayor porcentaje de estos son desarrollos europeos.

Los primeros indicadores se basaban en la descongelación del hielo, cambiaban su forma al descongelarse y esto era indicador de que la temperatura había sido modificada, la principal desventaja de estos métodos es que son reversibles y por lo tanto la respuesta puede ser alterada.

Otros indicadores se basan en los puntos de fusión de distintas sustancias y estos solo responderán una vez alcanzado el punto de fusión.

Existen también los indicadores basados en reacciones enzimáticas y procesos de polimerización, cuya respuesta está en función de la temperatura. Hasta el momento no existía uno basado en reacciones microbiológicas, como el propuesto en este trabajo, cuya respuesta también está en función de la

temperatura. La ventaja de estos métodos es que la reacción es irreversible y será mas rápida cuanto más se incremente la temperatura, y más lenta si ésta se reduce.

## 6.- CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo se pueden enunciar las siguientes conclusiones:

1. La concentración de bacterias lácticas mas adecuada para el kit es de  $1 \times 10^5$  UFC/ml
2. Los resultados de viraje del kit son inalterables, confiables y de fácil interpretación por lo que el kit representa una alternativa viable para conocer si un alimento perecedero se ha mantenido en refrigeración.
3. Las ventajas que presenta el Kit son:
  - No requiere de personal especializado (técnico o profesionalista) para realizar el monitoreo de la cadena de frío.
  - El personal que lo emplee no requiere de capacitación.
  - No requiere de equipo costoso para su interpretación.
  - Permite tomar acciones preventivas y correctivas en el control de la cadena de frío.

## **7.- RECOMENDACIONES**

Se propone continuar la investigación con el objetivo principal de correlacionar el cambio de color que da el Kit de monitoreo al romperse la cadena de frío, con la contaminación microbiana de diferentes productos perecederos.

Un aspecto más a seguir investigando es la conservación de bacterias lácticas por el método de secado al vacío propuesto en este trabajo, con la finalidad de encontrar las condiciones adecuadas de conservación.

Por último será necesario realizar una evaluación financiera para ver si es posible implementar una empresa que se dedique a la producción de este Kit.

## 8.- BIBLIOGRAFIA

Alais, Charles. 1970. Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. Compañía editorial continelas. S.A. C.V. México, pp. 195-197.

Amezquita, A., Weller, C.L., Wang, L., Thippareddi, H., Burson, D.E. 2005 Development of an integrated model for heat transfer and dynamic growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of cooked boneless ham. *International Journal of Food Microbiology* 101 (2): 123-144.

Baranyi, J., Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.

Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J.1999. Brock Biología de los microorganismos 8<sup>a</sup> ed. Ed Prentice Hall, Madrid, pp. 720.

Brody, A. 2001 What's active about intelligent packaging. *Food Technology* 55(6), 75-78.

Check Point® Technology. [www.vitsab.com](http://www.vitsab.com)

Dart, M.G., Mesta, J., Crenshaw, C., Ericsson, S.A. 1994. Modified resazurin reduction test for determining the fertility potencial of bovine spermatozoa. *Arch. Androl.* 33(2): 71-75.

Demeter, K.J. 1969. Lactobacteriología. Ed. Acribia, Zaragoza, España.

Demeter, K.J. & Elbertzhagen, H. 1971. Elementos de microbiología Lactológica. Ed. Acribia Zaragoza, España. pp. 20

Erb, R.E., Ehler, F.H. 1952. Modified resazurin reduction test for estimating fertilizing capacity of bull semen. *Journal of Dairy Science*. 35: 881-888.

FreezeWatch™ Indicators. Product Information. 3M Microbiology.  
[www.3M.com/microbiology](http://www.3M.com/microbiology)

Gilliland, S.E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 87: 175-188.

Glass, R.H., Drouin, M.T., Ericsson, S.A., Marcoux, L.J., Ericsson, R.J., Sullivan, H. 1991. The resazurin reduction test provides an assessment of sperm activity. *Fertil. Steril.* 56: 743-746.

Goldhaber, S.E. 1982. Estudio para la Producción y Conservación de algunos microorganismos de interés lactológico. Tesis Maestría. U. Iberoamericana. México

Hernández, P.G. 1992. Estudio sobre la producción de iniciadores lácticos en cultivo mixto. Tesis Maestría, UNAM, México.

Jay, J.M. 1992. *Microbiología moderna de los alimentos*. 3ª ed. Ed. Acribia, España.

James, S. 1996. The chill chain from carcass to consumer. *Meat science* 43 : 203-216.

James, S.J., James, C. 2002. *Meat refrigeration*. 347p. CRC Press, Boca Raton, FL.

Koutsoumanis, K. 2001. Predictive modeling of the shelf life of fish under nonisothermal conditions. *Applied Environmental Microbiology* 64(4): 1821-1829.

Koutsoumanis, K., Taoukis, P., Nychas, G. 2004. Development of a Safety Monitoring and Assurance System for chilled food products. *International Journal of Food Microbiology* 100: 253-260.

Lebert, I., Robles-Olvera, V., Lebert, A. 2000. Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* in meat. *International Journal of Food Microbiology* 61: 27-39.

Lerche, Martin. 1969. *Inspección veterinaria de la leche*. Ed Acribia. Zaragoza, España. pp. 229.

Li, K.Y., Torres, J.A., 1993. Water activity relationships for selected mesophiles and psychrotrophs at refrigeration temperature. *Journal of Food Protection* 56(7): 612-615.

Mallikarjuna, R.Y., Karunasagar, I., Karunasagar, I. 1990. Resazurin test for estimating bacteriological quality of fishes. *Fishes Research*. 9: 75-79.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. 2004. *Brock Biología de los microorganismos* 10<sup>a</sup> ed. Ed Pearson Educación, S.A. Madrid. pp. 943-944

McMeekin, T.A., Olley, J.N., Ross, T., Ratkowsky, D.A. 1993. *Predictive microbiology: Theory and application*. Research Studies Press Ltd., John Wiley & Sons Inc., Taunton, U.K. pp. 340.

Manual de agricultura No. 669. 1995. *Métodos para el cuidado de alimentos perecederos. Durante el transporte por camiones*. Departamento de agricultura de los Estados Unidos. Servicio de Mercadeo Agrícola. División de transporte y mercadeo.

Moore, C. & Sheldon, B. 2003. Evaluation of time-temperature integrators for tracking poultry product quality throughout the chill chain. *Journal of Food Protection* 66(2): 287-292.

Pérez Gavilán, E.J. 1993. Equipo para determinar la calidad microbiológica de la leche y procedimiento para emplearlo. Patente 170279, UNAM, México.

Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D. A. 2004. *Microbiología*. 5ª edición. Ed. Mc Graw Hill. España.

Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A., Ball, A. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology* 149: 1-5.

Ray, B. 2004. *Fundamental Food Microbiology* 608p. CRC Press, Boca Raton, FL.

Reyes, G.R. 1988. Diseño de un Kit de resazurina para el control microbiológico de la leche fluida. Tesis profesional. UNAM. México.

Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos. Los diez patógenos de alimentos menos apreciados. Documento publicado en Junio de 1998. <http://www.FoodSafety.gov>

Sigala, A.J. 2000. Estudio de la Actividad Ácido Láctica de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y su relación con el perfil de plasmidos durante el almacenamiento en refrigeración . Tesis Licenciatura. UNAM. México.

Simpson, R., Li, K-Y., & Torres, J.A. 1989. A management tool to improve the microbial quality of refrigerated foods. In *Proceedings of the International Conference on Technical Innovations in Freezing and Refrigeration of Fruits and Vegetables*. Universidad de California, Davis, CA, pp.171-184.

Smith-Simpson, S., Schaffner, D.W. 2005. Development of a predictive growth of *Clostridium perfringens* in cooked beef during cooling. *Journal of Food Protection* 68(2): 336-341.

Stiles, M. E., Holzapfel, W. H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36: 1-29

Tirado, J., Paredes, D., Velásquez., G., Torres, J. A. 2005. Crecimiento microbiano en productos carnicos refrigerados. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5: 66-76.

Tirado, J., Paredes, D., Velásquez., G. J., Torres, J.A. 2006. Control de la Cadena de Frío para Productos Cárnicos Refrigerados. *Industria Alimentaria* 28:22-26.

Vainionpää, J., Smolander, M., Alakomi, H-L., Ritvanen, T., Rajamäki, T., Rokka, M., Ahvenainen, R. 2004. Comparison of different analytical methods in the monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts using principal component análisis. *Journal of Food Engineering* 65: 273-280.

Villanua, F. 1990. Alimentos congelados: procesado y distribución / Instituto Internacional del Frío. 1ª edición. Ed. Acribia Zaragoza, España. pp 28-30

3M MonitorMark™ Time Temperature Indicators. [www.3M.com/microbiology](http://www.3M.com/microbiology)