



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE CONSERVACIÓN DE
***Lactococcus lactis* PARA SU INDUSTRIALIZACIÓN**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

LAURA HERNÁNDEZ VENTURA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: Profesor: Olga del Carmen Velázquez Madrazo

VOCAL: Profesor: Miguel Ángel Hidalgo Torres

SECRETARIO: Profesor: José Pablo Pérez Gavilán Escalante

1er. SUPLENTE: Profesor: Alejandro Camacho Cruz

2° SUPLENTE: Profesor: Karla Mercedes Díaz Gutiérrez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José Pablo Pérez Gavilán Escalante

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.A Luis Macedo Segura

SUSTENTANTE:

Laura Hernández Ventura

*"La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones
y la fuente de vida de todo progreso".*

Louis Pasteur

*"Los diamantes son solo pedazos de carbón
que siguieron haciendo su trabajo".*

Malcom Forbes

*"Todos nuestros sueños pueden convertirse en realidad
si tenemos el coraje de perseguirlos".*

Walt Disney

"Nada es especialmente difícil si divides el trabajo en pequeñas tareas".

Henry Ford

*"...las palabras son palabras, las explicaciones son explicaciones,
las promesas son promesas. Sólo los hechos son realidad"*

Harold Geneen

*"El día que el hombre se diese cuenta de sus profundas equivocaciones,
habría terminado el progreso de la ciencia."*

Marie Curie

A **Dios**, por la vida y oportunidad que me permitió lograr este sueño.

A **mis padres**, que me han apoyado en todo momento.

A mi **Universidad**, máxima casa de estudios que me abrió sus puertas hace 8 años.

A la maravillosa **Facultad de Química**, que hoy me otorga el título tan anhelado de Química de alimentos, que me apoyó de una y mil maneras para ser una buena estudiante y terminar mi carrera, que me dio las mejores experiencias de vida y me enseñó que la virtud más grande es la paciencia, que me permitió conocer a las mejores personas, l(A)s mejores maestr(A)s y l(A)s mejores amig(A)s que hicieron mi estadía más feliz y que me hizo crecer como persona.

Al **Dr. Pablo Pérez-Gavilán**, que me guió en el desarrollo de este proyecto, que con su dedicación y meticulosidad hicieron que esta tesis brillara, que con sus experiencias de vida me abrió un nuevo panorama y me enseñó a ser una mejor profesionalista orgullosamente egresada de la **UNAM**. Al **Q.A Luis Macedo** quien desde el primer momento me ayudó en este proyecto, quien hizo que el tiempo se fuera más rápido con sus buenas pláticas y en quien encontré un amigo en éste tiempo.

A los honorables **miembros del jurado**, quienes destinaron su tiempo para enriquecer mi tesis con sus comentarios.

¡¡Gracias!!!

DEDICATORIAS

A mi Mamá la persona más importante en mi vida. Este es tu logro, por hacer de mí una mejor persona día con día. Por todos tus cuidados desde siempre, porque has sacrificado muchas cosas por verme feliz y ten por seguro que yo haré lo mismo por ti. Porque todos tus regaños y palabras me hicieron una mujer fuerte. Porque crees siempre en mí y me demuestras tu amor incondicional. Porque siempre has querido que mis hermanos y yo nos superemos y nos has dado armas para lograrlo. Te dedico mi logro más grande hasta ahora por ser la mejor mamá del mundo.

A mi Papá por todo su apoyo y amor. Porque sin su ayuda en cálculo y física no hubiera llegado tan lejos. Porque a pesar de ser burro blanco y yo puma se siente orgulloso de mí.

A mis hermanos Toño y Cristina, porque sé que lograrán todo lo que se propongan, porque quiero ser un buen ejemplo para ustedes y un apoyo para toda la vida. Aunque soy la primera en titularme sé que en pocos años habrá dos Ingenieros más en casa.

A Ricardo, por ser parte fundamental de mi vida. Por estar a mi lado en esta meta tan importante que es tan mía como suya. Por el amor incondicional que me ha demostrado más de una vez y de mil maneras diferentes. Eres muy importante para mí y desde hace 5 años y 8 meses me ha demostrado que cuento con él por siempre y para siempre. Por todo su apoyo en los momentos tristes o difíciles y por estar conmigo en los momentos más importante y más felices, por todos los buenos consejos, por todos los besos que me motivaron a lograr más cosas. Porque estando a tu lado me dan ganas siempre de ser una mejor mujer. Por todo el camino que nos queda por recorrer y a tu lado siempre será más sencillo. Por ser mi novio, mi amigo, mi confidente... ¡Te amo mucho!

A mi Abuelita Bety y a mi abuelito Pepe[†], quien siempre nos han demostrado su cariño a mí y a mis hermanos. Por todo el apoyo que le han(dieron) a mi mamá. Porque sé que se sentirán muy orgullosos de verme lograr este sueño. ¡Los quiero mucho!

147 La 57 lanthanum	28 U 119 uranium	22 Ra 9 radium
------------------------------	---------------------------	-------------------------

Índice

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	3
2.1 Características de las bacterias lácticas.....	3
2.2 Aplicaciones tecnológicas de las bacterias ácido lácticas.....	8
2.3 Características de la resazurina.....	14
2.4 Características del secado: aire y vacío.....	16
2.5 Cadena de frío.....	18
2.6 Indicadores tiempo- temperatura.....	20
2.7 Conservación de bacterias.....	25
2.8 Funcionamiento del <i>Biosensor R y L^{MR}</i>	30
3. Metodología.....	32
3.1 Curva de crecimiento.....	32
3.2 Impregnación del material absorbente.....	34
3.3 Secado del material absorbente.....	35
3.4 Influencia de la humedad en la viabilidad de bacterias.....	38
3.5 Impregnación y secado de resazurina.....	38

3.6	Funcionamiento de <i>Biosensor R</i> y L^{MR}	39
3.7	Vida de anaquel.....	41
4.	Resultados y discusión.....	42
4.1	Curva de crecimiento.....	42
4.2	Secado del material absorbente.....	43
4.3	Influencia de la humedad en la viabilidad de las bacterias.....	47
4.4	Impregnación y secado de resazurina.....	52
4.5	Funcionamiento del <i>Biosensor R</i> y L^{MR}	53
4.6	Vida de anaquel.....	55
5.	Conclusión.....	58
6.	Bibliografía.....	60
7.	Apéndice.....	65

1. Introducción

La temperatura es un factor crítico que favorece el desarrollo microbiano en los alimentos, por lo que es importante el monitoreo del producto desde su punto de venta hasta el momento de su consumo.

Los indicadores tiempo-temperatura (ITT) consisten en etiquetas adheridas al envase que monitorean el factor temperatura integrado con el tiempo, indicando el efecto acumulativo del tiempo y la temperatura de almacenamiento así como transporte sobre la vida útil del alimento. Los ITT permiten a los consumidores sentirse seguros de lo que están comprando. De manera que un ITT, en condiciones adecuadas de manejo, garantizará la calidad y la integridad de los alimentos y permite prevenir un riesgo potencial por ingesta de un alimento en mal estado.

Biosensor R y L^{MR} tiene la capacidad de establecer una relación entre la cantidad de microorganismos presentes con respecto al cambio de color en el indicador así como el tiempo en el cual ha sido expuesto el alimento a dos temperaturas: refrigeración (4°C) y temperatura ambiente (23±2°C). Específicamente se refiere a un dispositivo a base de bacterias lácticas y un indicador redox que permite vigilar si un producto fue mantenido en condiciones de temperatura adecuadas durante su transporte, almacenamiento y exhibición (Dispositivo para vigilar la cadena en frío de productos biológicos y su proceso de producción, Patente en trámite,

UNAM). Mediante un cambio de color, azul a rosa, el *Biosensor R* y L^{MR} indicará si la cadena de frío en algún momento fue interrumpida.

Si se logra identificar el método óptimo de impregnación y condiciones secado lograremos que, de manera confiable, el dispositivo pueda monitorear el punto en el cual un alimento que ha perdido la cadena de frío y si puede o no ser apto para su consumo.

Objetivo.

- Desarrollar un método de optimización para el funcionamiento de un kit a base de *Lactococcus lactis* y resazurina para monitorear la cadena de frío de productos perecederos.

Objetivos específicos.

- Evaluar la viabilidad de las bacterias lácticas (*Lactococcus lactis*) durante el secado.
- Obtener las condiciones de secado y concentración de resazurina que permitan el funcionamiento óptimo del kit.
- Realizar pruebas de funcionamiento al dispositivo.
- Monitorear la vida de anaquel del dispositivo en almacenamiento.

2. Marco teórico

2.1 Características de las bacterias lácticas.

La clasificación de las bacterias lácticas se basa en la morfología, la forma de fermentar glucosa, desarrollo a diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico que producen, la habilidad de crecer a altas concentraciones de sal, y la tolerancia a la alcalinidad y acidez (Konings W., Kuipers O. y Huis in't Veld J,2004).

Las bacterias lácticas son microorganismos productores de ácido láctico a partir de azúcares. El grupo de bacterias ácido lácticas esta conformado por cocos, cocobacilos y bacilos. Actualmente en la comunidad científica, se acepta clasificarlas en los géneros: *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Oenococcus*.

Su temperatura óptima de crecimiento esta entre 20 y 30°C (bacterias lácticas mesófilas) aunque también son capaces de crecer a 5°C y otras a 45°C. Toleran concentraciones relativamente altas de ácido y valores de pH más bajos que otras bacterias (la mayoría crece entre un pH de 4 o 4.5). Se trata de bacterias Gram positivas que tienen una pared muy gruesa. Son inmóviles, no producen esporas, son anaerobias pero aerotolerantes.

Dependiendo de la ruta metabólica que utilizan estas bacterias para hidrolizar las hexosas producidas a partir de la lactosa, se clasifican en *homofermentativas*, cuando a partir de una molécula de lactosa producen cuatro de ácido láctico y *heterofermentativas*, cuando producen dos moléculas de ácido láctico a partir de una de lactosa. (Del Castillo y Mestres, 2004). Carecen de sistemas de transporte de electrones funcionales o de citocromos, y obtienen su energía por fosforilación a nivel sustrato a la vez que oxidan carbohidratos (Madigan T., Martinko J., Parker J, 2004).

Las bacterias lácticas poseen proteasas ligadas a la pared que pueden hidrolizar parcialmente la caseína en péptidos asimilables que son degradados subsecuentemente por las peptidasas de la membrana y el citoplasma.

La actividad de las bacterias lácticas limita el crecimiento de otras bacterias, tanto por efecto de la baja en el pH como por ciertas sustancias inhibidoras producidas por algunas especies.

Metabolismo de la 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 (Kandler, 1983).

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).

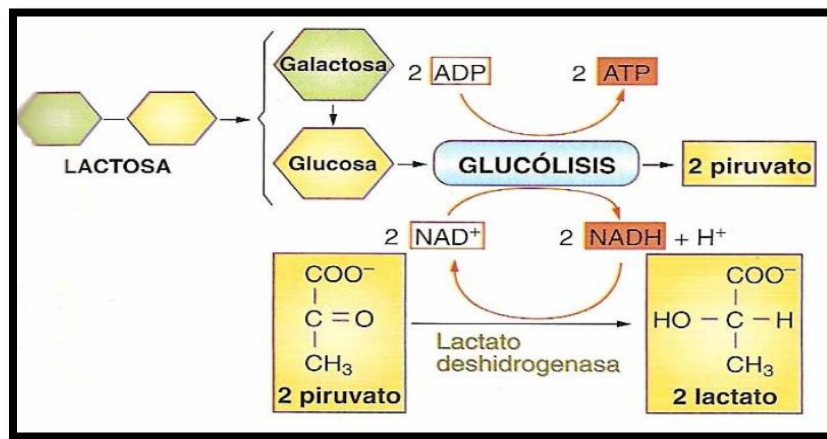


Fig. 1: Ruta homofermentativa de utilización de lactosa en las bacterias lácticas.

✓ **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).

✓ **Conversión de hexosa a triosa fosfato.**

Posteriormente a su transporte e hidrólisis, la enzima fosfo- β -galactosidasa ($f\beta gal$) 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.

✓ **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 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.

✓ **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 NAD^+/NADH . La reacción de la triosa fosfato deshidrogenasa requiere NAD^+ y puede cesar rápidamente a menos que el NADH producido se re oxide. Las bacterias lácticas regeneran el NAD^+ reduciendo el piruvato a lactato por medio de la lactato deshidrogenasa (Aznar R. y Zúñiga M).

Características del género Lactococcus.

Son cocos no esporulados, inmóviles, crecen a 10°C pero no a 45°C, se encuentran en parejas o en cadenas cortas, catalasa negativos, anaerobios facultativos, homofermentativos y con necesidades nutricionales complejas. La longitud de la cadena depende principalmente de la cepa y en ocasiones por el medio de crecimiento.

Antiguamente incluidos en el género *Streptococcus*, han sido elevados a la categoría de género, siendo admitidas las cuatro especies y tres subespecies siguientes:

- *L. lactis ssp. Lactas*
- *L. lactis ssp. crémares*
- *L. lactis ssp. hordiate*
- *L. garbeare*
- *L. plantaron*
- *L. raffinolactis.*

Algunas cepas crecen en soluciones de NaCl hasta el 4%, excepto *L.lactis ssp. cremoris* la cual únicamente tolera 2% (p/v). Se aíslan de leche cruda y también en la flora del rumen. Siendo las especies *L. lactis ssp. lactis* y *L. lactis ssp. cremoris* las más estudiadas por su capacidad de producir y excretar una familia de pequeños polipéptidos de 3500 Da. frecuentemente en forma de dímeros o tetrámeros considerados antibióticos. Estos péptidos se denominan bacteriocinas. Su modo de acción se restringe a bacterias Gram positivas, actúa también sobre células vegetativas impidiendo la germinación de las esporas como *Bacillus* y *Clostridium* (Yang, Johnson y Ray, 1992 y Leveau y Bouix, 2000).

2.2 Aplicación tecnológica de las bacterias lácticas.

↻ Aplicación de bacteriocinas en el control de contaminación de la carne.

El uso de bacterias ácido lácticas (BAL) en la biopreservación de alimentos ha tomado gran importancia en los últimos años debido a la capacidad para controlar

microorganismos patógenos y alterantes. La aplicación de cepas biopreservantes así como de los extractos y metabolitos producidos por ellas, han demostrado tener control sobre diversos microorganismos no deseados consiguiendo alargar la vida útil de los alimentos y dar seguridad contra bacterias que puedan afectar la salud del consumidor. Los metabolitos producidos por las bacterias ácido lácticas, haciendo especial énfasis en las bacteriocinas que son sustancias antimicrobianas que han demostrado ser eficaces en el control de diversos microorganismos y han tenido exitosa aplicación a los alimentos. El uso de la biopreservación considerado como una tecnología de barrera que combinado con otros métodos de conservación como la refrigeración y ligado a Buenas Prácticas de Manufactura pueden ser una opción interesante para disminuir la adición de preservantes químicos, proporcionando alimentos seguros (Milena S., Suárez H. y Zapata S. 2009).

La producción de bacteriocinas de amplio espectro de inhibición contra otras bacterias ácido lácticas de otros géneros es una herramienta importante para el control de la fermentación láctica en productos cárnicos. La utilización de extractos libres de células presenta muchas ventajas comparado con la utilización de cultivos íntegros ya que se minimizan los cambios de textura y sabor, especialmente en productos no fermentados. Sin embargo la utilización de cultivos iniciadores con cepas productoras de bacteriocinas durante el proceso de fermentación de embutidos fermentados resulta en productos de alta calidad y homogeneidad además de controlar efectivamente a microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium*

perfringens y *Staphylococcus aureus*. El uso de bacteriocinas en el control de patógenos es de especial interés en productos frescos o mínimamente procesados, en donde la elevada acidificación resulta indeseable.

Para la aplicación de cultivos productores de bacteriocinas se deben estudiar y comprobar fehacientemente sus propiedades como cultivo iniciador, su desempeño durante los procesos respectivos y la calidad del producto. Diversos autores realizaron estudios sobre el comportamiento de cepas potenciales productoras de bacteriocinas en el sistema cárnico. Los trabajos tendientes a controlar *Listeria monocytogenes* se realizaron mayormente utilizando *Pediococcus acidilacti*, uno de los cultivos iniciadores mas utilizados en la fabricación de embutidos fermentados estilo americano. Observaron una reducción 2.2 log UFC, en los recuentos de *L. monocytogenes* en lotes de carne fresca inoculadas con una cepa bacteriocigénica de *P. acidilacti*. Por otra parte los niveles de *L. monocytogenes* permanecieron constantes durante 14 días en carne molida inoculada con una cepa bacteriocigénica de *Lactobacillus sake*, mientras que en la muestra control el patógeno creció exponencialmente. Existen diferentes reportes sobre la utilización de lactobacilos bacteriocigenicos en embutidos fermentados de tipo europeo. Se encontraron diferencias de 1.25 log en los recuentos de *L. monocytogenes* en embutidos secos fermentados contaminados por una cepa de *L. sake* productora de la bacteriocina sakacina.

Actualmente varias cepas de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium* y otras, han sido estudiadas exhaustivamente a nivel estructura genética, lo que ha permitido esclarecer gran parte de los mecanismos de acción e

inmunidad de cepas productoras, mecanismos de transporte, etc. Los avances en ésta área se orientan además a la optimización de cepas productoras de bacteriocinas de amplio espectro y el desarrollo de cepas hiperproductoras de bacteriocinas de interés en el control de patógenos y alteraciones alimentarios.(Schneider R., 2007)

➤ Extracción de caroproteínas a partir de residuos de camarón fermentado.

La axantina es el pigmento más abundante en los residuos crustáceos. Debido a su color particular es empleado en la pigmentación de salmónido, como la trucha arcoíris, en sistemas de acuicultura. La axantina esta unida a una proteína, esta asociación da como resultado el color rosa-anaranjado del pigmento. Los residuos de camarón además de ser un problema ecológico debido a su descomposición al aire libre, es una fuente excelente de axantina. Se estudió entonces la fermentación láctica, para desproteínizar los residuos de camarón, como medio para estabilizar a estos pigmentos.

Los cultivos iniciadores lácticos de *Lactobacillus sp.* mostraron que descendían el pH en 24 horas, y mediante tres periodos de extracción por HPLC usando columna reversa se obtiene una mayor cantidad del pigmento en comparación a lo no fermentado al favorecer la hidrólisis del pigmento-proteína. (Armenta R., Guerrero-Legarreta I. y Huerta S., 2002).

Eliminación del sabor amargo en queso

El sabor amargo es un defecto relativamente frecuente en el queso, cuya principal causa es la acumulación de péptidos amargos, generalmente hidrófobos. Esta acumulación se produce cuando la velocidad de formación de péptidos amargos es superior a la velocidad de degradación. Las peptidasas de algunas bacterias lácticas son eficientes en la degradación de péptidos hidrófobos. Los lactococos presentaron mayor actividad acidificante y proteolítica. Un fermento compuesto por cuatro aislamientos de *Lactococcus ladis subsp. lactis* en la elaboración de queso Manchego a partir de leche cruda y de leche pasteurizada de oveja muestra características generales y organolépticas de los comparables a las de los quesos elaborados con un fermento comercial.

Además, se comprobó la disminución del nivel de amargor en los quesos fabricados con el nuevo fermento. La actividad peptidásica más elevada, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. Se observa la disminución del nivel de estos péptidos debida a la adición de los adjuntos. Un 1% de los adjuntos seleccionados disminuyen significativamente el sabor amargo en queso madurado durante 60 días.

Las bacterias ácido-lácticas en la industria alimenticia.

Su uso más común se relaciona con la producción de productos lácteos fermentados, como el yogurt, el queso, la mantequilla, la crema de leche, el kefir y el kumis. Constituyen un gran grupo de microorganismos benignos que producen

ácido láctico como producto final del proceso de fermentación. Se encuentran en grandes cantidades en la naturaleza y también en nuestro sistema digestivo. Aunque se las conoce sobre todo por sus aplicaciones en la industria láctea, también se las usa para curar pescado, carne y embutidos.

El ácido láctico le confiere a la leche fermentada ese sabor ligeramente acidulado, y otros derivados de la fermentación producen a menudo otros sabores o aromas.

El acetaldehído, por ejemplo, da al yogurt su aroma característico, mientras que el diacetilo confiere un sabor de mantequilla a la leche fermentada. Pueden agregarse levaduras a la fermentación, como es el caso del kefir, el kumis y el leben (variedades de yogurt), donde el alcohol y el dióxido de carbono producidos por la levadura dan una frescura y una textura características.

Con respecto al yogurt, en su elaboración se emplean dos bacterias: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, que se caracterizan porque cada una estimula el desarrollo de la otra.

Esta interacción reduce considerablemente el tiempo de fermentación y el producto resultante tiene peculiaridades que lo distinguen de los fermentados con una sola cepa de bacteria.

Además de su empleo en la elaboración del yogurt y otros productos, las bacterias ácido lácticas son explotadas como cultivos probióticos, ya que se complementan con las bacterias presentes en nuestra flora intestinal y contribuyen al buen funcionamiento del aparato digestivo. Ante la creciente demanda de los

consumidores, cada día más preocupados por la salud, el mercado internacional de estos productos va en aumento. (ArgenBIO, 2007).

2.3 Características de la resazurina.

La resazurina es un indicador redox, una oxazona que se reduce en dos etapas: 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 incoloro que por oxidación puede pasar nuevamente a resorufina (rojo-rosa) como se muestra en la reacción de a continuación.

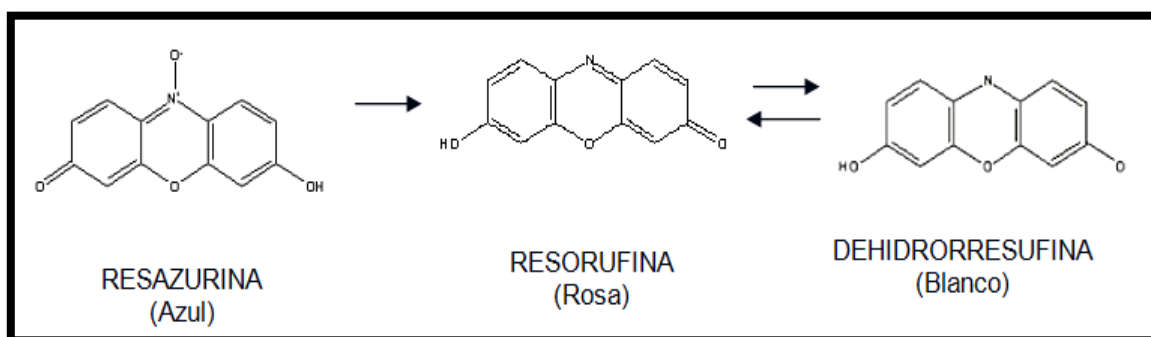


Fig. 2: Reacción de la resazurina.

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, G., 1988)

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 diferentes 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 la rapidez e intensidad se dan las modificaciones cromáticas del colorante añadido a la leche por la actividad de los microorganismos. (Demeter, K.J. y Elbertzhagen, H. 1971).

Según la teoría de Wieland, los métodos de transformación se basan en la reducción de la sustancia agregada (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, K.J. 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, más rápidamente se realiza el cambio de color.

2.4 Características del secado: aire y vacío.

↗ Secado con vacío.

El secado al vacío es un proceso importante para secado de materiales térmicamente sensitivos, que son ampliamente usados en industrias farmacéuticas y químicas, así como en productos alimenticios y biotecnología. El proceso de secado a vacío puede ser considerado de acuerdo con las condiciones físicas, para añadir calor y remover vapor de agua. La evaporación del agua procede más rápido a bajas presiones. Bajas temperaturas pueden ser usadas en conjunto al vacío para ciertos materiales que se pueden decolorar o descomponer a altas temperaturas.

El secado al vacío consigue la máxima eficiencia si se pasa una ligera corriente de aire seco. Es preferible el secado al vacío a una temperatura de 60°C-70°C al secado en un horno de aire (Greenfield. 2003).

✓ *Ventajas*

- El secado al vacío es ideal para materiales que pueden ser dañados o cambiados.
- El vacío remueve humedad mientras previene oxidación o explosiones que pueden ocurrir cuando ciertos materiales se combinan con aire.

- Es ideal en situaciones donde un solvente debe de ser recuperado o donde algunos materiales tienen que secarse hasta niveles muy bajos de humedad.
 - El secado a bajas presiones, baja el punto de ebullición y provee una mayor diferencia de temperatura entre el medio calefactor y el producto.
- ✓ Desventajas
- Requiere de un mayor consumo de materiales metálicos para la construcción de equipo más complejo que el requerido para otros procesos.
 - Equipos con alto costo.

Secado con aire.

La operación de secado es un proceso que implica transferencia de masa entre un gas y un sólido, donde la humedad contenida en el sólido se transfiere por evaporación hacia la fase gaseosa. En el secado por arrastre se realiza poniendo lo que se desee secar en contacto con un medio, normalmente aire, relativamente seco (es decir, que tiende a retirar agua). Este medio se renueva lo suficientemente a menudo para que el secado prosiga hasta el grado de deshidratación deseado.

El secado depende de:

- Temperatura: acelera la eliminación de humedad.

- Humedad relativa del aire: razón de la presión de vapor de agua presente con respecto a la presión de saturación a esa temperatura.
- Equilibrio en el contenido de humedad: es el equilibrio establecido entre la humedad y el vapor contenido en el agente de secado.
- Velocidad del aire: rapidez de transmisión de energía requerida para calentar el agua contenida en el material para facilitar su eliminación y transportar la humedad saliente.
- Estructura del sólido.

2.5 Cadena de frío en los alimentos

La cadena de frío designa a los diferentes eslabones que permiten mantener a temperatura óptima los productos alimenticios después de su producción hasta que sean consumidos.

Encontramos los eslabones siguientes:

- 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 frío limita la propagación de microorganismos. Cualquier ruptura en la cadena de frío conlleva a una aceleración del desarrollo de microorganismos y por

consiguiente reduce la vida útil del producto o lo convierte en peligroso. (Rapin y Jacquard ,1996).

Del estudio cinético de las reacciones químicas, se conoce que la velocidad de reacción de todos los procesos disminuye con la temperatura. Por cada 10°C de temperatura que baje la velocidad disminuye 2 a 3 veces. Como estas reacciones significan en la mayor parte de los casos disminución del valor nutrimental de los alimentos se espera que si son almacenados a 0°C durará un tiempo 15 veces mayor que almacenados a 30°C (Plank, 2005).

Un estudio realizado en el Reino Unido mostró que los consumidores tardan un promedio de 43 minutos para llegar desde las tiendas de autoservicio hasta sus hogares, y otros 13 minutos en colocar en el refrigerador alimentos refrigerados. (James, S. 2002).

En el caso de Chile, el tiempo medio que tarda una persona en realizar una compra es de aproximadamente de 30 minutos, además se considera que el tiempo que tarda en trasladarse es de 10 a 14 minutos. (Dirección de promoción de exportaciones, 2010).

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).

2.6 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 ,2003).

Los indicadores tiempo-temperatura (ITT) consisten en etiquetas adheridas al envase que monitorean el factor temperatura integrado con el tiempo, indicando el efecto acumulativo del tiempo y la temperatura de almacenamiento y transporte sobre la vida útil del alimento. Se utilizan por ejemplo, para monitorizar la cadena de frío en transportes y para complementar la información de vida útil (fecha de caducidad).

Estos indicadores deben cumplir una serie de requisitos, como ser dependientes de la temperatura, ser irreversibles y tener un umbral de rechazo, es decir, un punto a partir del cual indique que el alimento debe ser rechazado por no ser aptas sus condiciones para el consumo.

Algunos tipos de indicadores tiempo-temperatura se indican a continuación:

- Etiquetas sensibles a la temperatura.
- Indicadores de tiempo/ temperatura
- Indicadores de fuga.

Los ITT permiten a los fabricantes rastrear sus alimentos a lo largo de la línea de suministro, y permite a los consumidores sentirse seguros de lo que están comprando. Suelen adoptar la forma de una pequeña etiqueta que se adhiere a la parte exterior del envase. Los ITT, por lo general, tienen una barra clara que se coloreará cuando la comida está expuesta a la temperatura incorrecta. Si las malas condiciones se corrigen, la etiqueta seguirá coloreada, mostrando que la comida estuvo expuesta, y la duración de la exposición. Otro tipo incorpora un círculo que se oscurece lentamente conforme la comida se mantiene en condiciones de calor.

Los ITT externos son de gran utilidad, permitiendo al personal, de forma rápida y precisa, evaluar la seguridad de los alimentos. En algunos casos, una exposición mínima a las malas condiciones puede no ser perjudicial y el alimento seguirá siendo seguro para comer, aunque puede no tener un sabor óptimo. En otros, debe ser desechado. Controlando los alimentos, conforme se mueven a través de la cadena de suministros, las empresas pueden identificar y abordar los puntos críticos. Los consumidores en casa pueden estar seguros de que están manteniendo sus alimentos en un nivel saludable con la ayuda de los ITT.

Los ITT toman en cuenta un factor crucial que afecta a la seguridad alimentaria. Cuanto más tiempo los alimentos se mantienen en malas condiciones, sea calor extremo, congelación, o ambos, dependiendo del producto, lo más probable es que experimenten daños que pudieran convertirlo en inseguros para comer. Por lo general, si la comida ha estado expuesta a temperaturas críticas, esto se hace evidente al abrir el empaque. Sin embargo, esto no es siempre el caso, por lo que también es una manera ineficaz para detectar un daño potencial en los alimentos.

Los ITT muestran cuando un alimento ha estado en una situación crítica. Algunos alimentos, por ejemplo, no deben ser congelados, y utilizar un indicador permite mostrar que el alimento ha sido manipulado o almacenado de forma inadecuada, provocando que se congele y, potencialmente sea incomible. Otros alimentos son sensibles al calor y se usa el ITT para demostrar si la seguridad del alimento ha sido comprometida.

En el futuro los indicadores de tiempo-temperatura (ITT) serán los encargados de garantizar la frescura de los productos y de velar por que no se rompa la cadena de frío. Estas etiquetas señalarán con un cambio de color cuál es el grado de frescura de los alimentos. El consumidor dará cada vez más importancia a que el alimento sea fresco. Para muchos ésta es la característica más decisiva del envase. Por esa razón los consumidores estarán dispuestos a pagar más por envases que garanticen la frescura de los alimentos.

Esto hace presumir que los avances en envases y embalajes relacionados con el mantenimiento de la frescura constituirán una parte importante del desarrollo industrial.

Indicadores tiempo- temperatura en el mercado.

Podemos encontrar a indicadores como el **FreezeWatch** (PyMaH. Corp.). Es un simple indicador irreversible de temperatura, que al alcanzar una temperatura de -4°C, el líquido contenido en una ampolla 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. (3M, 2012).

En el estado de la técnica se encuentra el **Chillchecker** que es un indicador que contiene un papel 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. Es un termómetro auto-adhesivo que indica mediante el cambio de color blanco a azul/violeta que ha ocurrido un cambio de temperatura durante el transporte de productos perecederos. Es muy fácil de usar para ello hay que enfriar previamente, se adhiere al producto que se desea controlar y se activa presionando el centro de la etiqueta. Existen 8 tipos de indicadores que abarcan un intervalo de -17 °C a 20°C. (SURISA,2012)

Los indicadores **3M MonitorMark** 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. El punto de fusión del compuesto químico y el colorante azul dan una respuesta visible de la distancia recorrida desde el bulbo de origen hasta la mecha por donde difundirán una vez alcanzado el punto de fusión. (3M, 2012)

Las etiquetas **Check Point** son indicadores de historia completa que muestran respuesta independientemente de la temperatura establecida. Consiste de un dispositivo, que se describe en la WO993150, que comprende dos ampollas una de ellas contiene una mezcla de enzimas y la otra una solución lipídica y un indicador de pH. Para activar el dispositivo, se rompe la separación entre las ampollas y ambos compuestos se mezclan. Mientras la reacción se lleva a cabo, la sustancia lipídica se hidroliza y el cambio de pH se observa con una variación de color. La reacción depende de la temperatura, es decir a mayor temperatura la velocidad de la reacción aumenta, además es irreversible. (Vitsab, 2012)

Las etiquetas **Lifelines Fresh Scan** 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. (Lifelines Technology Inc.)

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 .

2.7 Conservación de bacterias.

La selección del método de conservación de bacterias y de sus características por largos periodos depende de varios factores, en los que podemos encontrar: la susceptibilidad del microorganismo (al proceso de conservación), la facilidad con la que puedan ocurrir cambios genéticos en la cepa, el número de muestras por conservar, el costo del proceso de conservación, el periodo durante el cual se desea conservar el microorganismo, el tipo de equipo disponible, la probabilidad de contaminación que exista en el medio.

Los cuatro procedimientos generales son:

Resiembra o el subcultivo

Este método consiste en sembrar el microorganismo en determinado medio de cultivo y, luego, conservarlo en refrigeración. El procedimiento se debe repetir cada cierto tiempo. El microorganismo se inocula en medio sólido o líquido y se deja crecer durante varios días, luego el cultivo se refrigera. Una de las desventajas es que los tubos se deshidratan en refrigeración y entonces el microorganismo muere; por esta razón, es necesario repetir el procedimiento periódicamente; al menos cada 6 meses. Éste es uno de los métodos de mantenimiento de cultivo mas simples y no requiere de equipo especializado y costoso; sin embargo es un método caro, ya que necesita mucha mano de obra por la periodicidad de las resiembras. Sus principales desventajas radican en la alta probabilidad de que se contamine el cultivo durante las resiembras y que el microorganismo sufra cambios genéticos y bioquímicos durante el proceso. (Hernández A.,2003)

Desección

En la desecación la ausencia de agua, los microorganismos no pueden crecer ni reproducirse pero pueden permanecer viables durante años. Después cuando vuelven a disponer de agua , pueden recuperar su capacidad de crecimiento y división. La resistencia de las células vegetativas varía según la especie y el ambiente que rodea al microorganismo. (Tortora, 2007)

La desecación consiste en remover el agua celular e impedir la rehidratación de las células de los microorganismos. Para llevarlo a cabo se inocula una muestra de cultivo en tierra húmeda estéril(material de soporte), se espera hasta que haya crecimiento(varios días) y, luego se seca con aire o al vacío.

Después el cultivo se guarda en una atmósfera seca o en refrigeración. Otros materiales de soporte pueden ser sílica gel, discos de gelatina y tiras de papel. Las ventajas que éste método presenta es que no se necesita un equipo especial para ejecutarlo y, si no sufre daño durante la desecación, el cultivo puede continuar viable por muchos años. (Hernández,2003)

Los métodos utilizados para la desecación requieren remover el agua o hacer que ésta sea menos disponible. Debe quedar en claro que aunque algunos microorganismos se destruyen durante el secado, este no es letal en sí mismo muchos pueden sobrevivir y permanecer inactivos, pero cuando el producto desecado vuelve a hidratarse, estos organismos reinician su crecimiento.

Congelación.

Logra periodos de conservación más largos (superiores a 20 años cuando se utiliza nitrógeno líquido). En el proceso de congelación, lo más importante es controlar la velocidad de disminución de la temperatura, porque si es muy lenta, los cristales que se forman a partir del líquido contenido en las células serán muy grandes y pueden romper la membrana celular. Existen sustancias como el dimetil

sulfóxido (DMSO) y el glicerol que ayudan a proteger a los microorganismos durante el proceso de congelación, se conocen como crioprotectores. Estas sustancias tienen un punto de congelación (menor a 0°C, o lo que reducen la velocidad de congelación de los componentes de la célula microbiana.

El método de congelación no requiere mucha mano de obra, pero el costo del equipo y del mantenimiento de los cultivos es alto. Debe permanecer en todo momento congelado para evitar que el cultivo se dañe.

El proceso de congelación puede clasificarse en:

Congelación ordinaria

Se mantienen temperaturas de -5 a -20°C; en este intervalo los microorganismos, permanecen viables por uno o dos años. El método no se recomienda para periodos de almacenamiento mayores, el cultivo por congelación se escoge directamente por centrifugación de una suspensión de microorganismos, o se prepara pasando una muestra de la suspensión en un tubo con las condiciones adecuadas para su crecimiento. Luego el cultivo se suspende en un medio con glicerol o DMSO.

Congelación ultra fría

Se efectúa en congeladores mecánicos a temperaturas entre -50 y -80°C se recomienda congelarlos a una velocidad de 1 a 2 °C/min hasta llegar a -30°C;

después de alcanzar esta temperatura, se acelera el proceso de congelación hasta lograr la temperatura deseada. Se ha observado que las cepas se conservan bien , durante cinco años a -60°C . (Rapin R., Jacquard P, 1996)

➤ Congelación con nitrógeno líquido.

El método logra temperaturas de -150 a -196°C . La velocidad de congelación debe ser 1 a 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar una temperatura de -30°C luego, 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta -56°C después se colocan las muestras directamente en nitrógeno líquido para acelerar el proceso de congelación. El metabolismo celular se detiene completamente a partir de los -130°C , por esta razón, si el microorganismo soporta el proceso de congelación su viabilidad permanece durante muchos años. (Rapin R., Jacquard P, 1996)

➤ Liofilización.

Es la remoción de agua de las células congelada (sólidas) a presión reducida (sublimación). Para llevar a cabo este procedimiento, se toma una muestra del cultivo por conservar y se suspende en algún medio con crioprotectores, como leche, suero o glutamato de sodio.

Se transfieren unas gotas de la muestra a una ampolla, se congela y se somete a alto vacío hasta que el agua celular se sublima (pasa del estado sólido al gaseoso) una vez liofilizada la cepa, la ampolla que la contiene se sella para impedir que el microorganismo se altere por el contacto con el medio ambiente.

Los microorganismos pueden mantener una viabilidad por veinte años o más. Además una vez liofilizadas, el cultivo no necesita tratamientos especiales, solo se debe mantener en refrigeración. Otra ventaja es que no requiere resiembras, lo que contribuye a evitar la contaminación y los cambios genéticos y bioquímicos en las células. (Hernández A. 2003)

2.8 Funcionamiento del *Biosensor R y L^{MR}*.

La presente invención es apta para vigilar la cadena de frío y específicamente se refiere a un dispositivo a base de bacterias y un indicador redox que permite vigilar si un producto biológico fue mantenido en condiciones de temperatura adecuadas durante su transporte, almacenamiento y exhibición.

El dispositivo permite saber, a través de un cambio de color irreversible de un indicador, el grado de contaminación microbiana que tiene un producto biológico en cierto momento de la cadena en frío, este dispositivo consta de un contenedor impermeable, transparente que a su vez contiene dos materiales absorbentes, uno con bacterias y el otro con el indicador, que están en contacto; y un contenedor de un líquido.

Para la presente invención se entenderá como material absorbente aquel que cumple con una absorción de entre 5 y 10 veces su peso en líquido. El material absorbente de la presente invención es impregnado con bacterias lácticas, el

material absorbente se impregna de resazurina. Éste se caracteriza porque a través de un cambio de color irreversible indica el grado de contaminación microbiana de un producto biológico.

El dispositivo de la presente invención se activa al ejercer presión sobre el contenedor que contiene el líquido de tal forma que el líquido sea liberado y humedezca los dos materiales absorbentes para que a partir de este momento, en caso de que se supere la temperatura de 4°C acelerará la proliferación de las bacterias impregnadas en el material absorbente manifestando una primera respuesta a través del cambio de color de resazurina a rosa. (Pérez- Gavilán, 2012).

3. Metodología

3.1 Curva de crecimiento.

Se empleó la cepa de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BM 147, perteneciente al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, mantenida en Medio industrial (*Cuadro 1*).

Cuadro 1. Composición del Medio industrial.

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

***El medio debe tener un pH de 6.5 ± 0.1 . Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. (Goldhaber, 1982).**

Se inoculó al 1% (v/v) con la cepa activada, un matraz de medio industrial. Se mantuvo en incubación a 29°C . Se monitoreó el crecimiento microbiano al momento de la inoculación así como en intervalos de 2 horas, durante las siguientes 10 horas. El último muestreo se realizó a las 24 horas.

Se realizaron diluciones de 10^{-1} a 10^{-9} en solución salina isotónica. Se tomó un mililitro de cada una de las diluciones y se sembró por duplicado en agar APT (*Cuadro 2*) por vertido en placa; dichas placas se incubaron durante 48 horas a 29°C . Pasado este tiempo se cuantificaron las colonias, se sacó el promedio de

las dos repeticiones y ese valor se multiplicó por el inverso de la dilución final donde se observó crecimiento (placas donde se observan de 25-250 UFC).

De esta manera se obtuvo la población microbiana viable por mililitro (UFC/mL) a diferentes tiempos, hasta llegar a la fase estacionaria.

Cuadro 2. Composición del agar APT. Difco™

Componente	g/L
Agar bacteriológico	14
Peptona de caseína	12.5
Extracto de levadura	7.5
D-(+) Glucosa	10
Cloruro de sodio	5
Tricitrato de sodio	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 . Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.**

3.2 Impregnación del material absorbente.

Se inoculó un matraz de medio industrial al 1%(v/v) y se incubó 24 horas a 29°C. El medio se filtró al vacío después de éste tiempo. Con el medio filtrado se trabajaron las diferentes diluciones para encontrar la concentración ideal (1×10^5 bacterias, reportado por Tafolla, 2007) para el funcionamiento del *Biosensor R y L*^{MR}. El material absorbente utilizado fue papel filtro industrial.

Para el secado del material absorbente al vacío se diluyó 1/100 con medio de dilución (*Cuadro 3*). Para el secado con aire se trabajaron las siguientes diluciones: 1/19 con medio de dilución, 1/10 con medio de dilución, 1/10 con solución salina al 0.85%, 1/10 con medio industrial.

Cuadro 3. Composición del Medio de dilución

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

***El medio no se esteriliza para evitar cambio del color. (Goldhaber,1982).**

Las diluciones se agitaron manualmente durante 30 segundos y se vertieron sobre una charola de acero inoxidable sanitizada con alcohol etílico. Con el objetivo de impregnar homogéneamente el material absorbente se sumergieron en el medio diluyente papeles filtro industrial de 15 cm x 10 cm estériles durante 10

segundos. Se retiró el exceso de medio, posteriormente los papeles húmedos se colocaron en el secador PPG. (*Figura 1 y Figura 2*)

3.3 Secado del material impregnado.

Para el secado se empleó el secador PPG. El secador de la *Figura 1* se utilizó en los experimentos con aire. Se secaron papeles filtro de 10 cm x 15 cm a diferentes flujos de aire: 29, 36, 65, 80, 90 L/min. Se monitoreó el tiempo total de secado. La *Figura 2* muestra el dispositivo empleado para el secado al vacío. Este experimento se realizó a 20 kPa y 6 L/. Se monitoreó el tiempo total de secado. A ambos dispositivos se les adaptó un sensor para medir la humedad relativa y la temperatura del aire de secado (*Figura 3*).

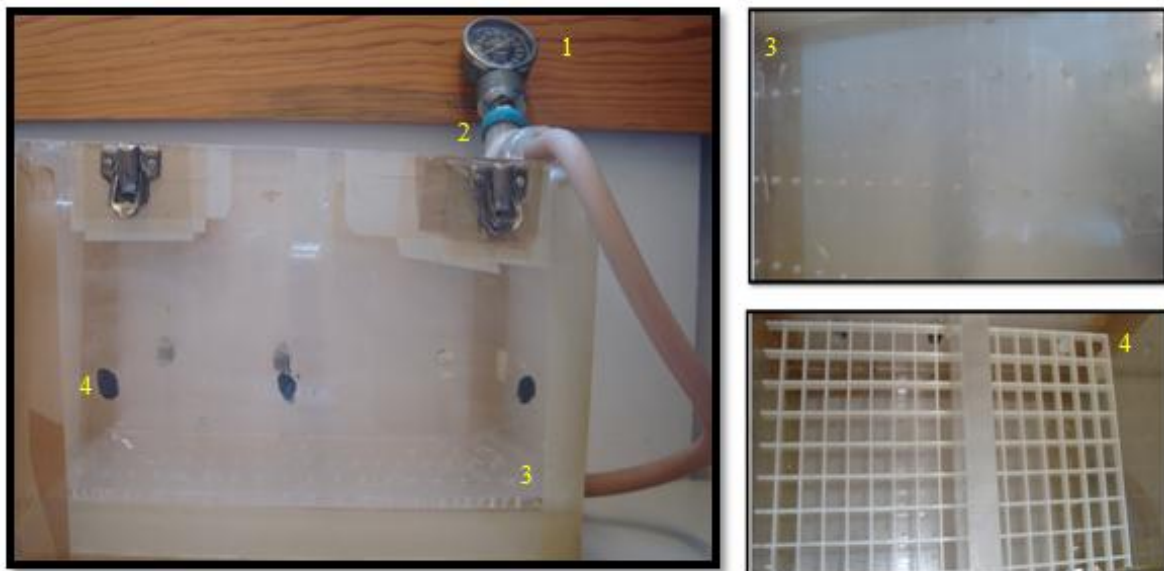


Fig. 1. Secador PPG. Donde, 1: Manómetro para controlar el flujo de aire. 2: Entrada del flujo de aire estéril y seco, 3: Salida del flujo de aire por 12 orificios de 2 mm de diámetro. 4: Soporte para el secado del papel filtro.



Fig. 2. Secador PPG con bomba de vacío. Donde, 1: Manómetro para controlar el flujo de aire. 2: Entrada del flujo de aire estéril y seco, 3: Salida del flujo de aire por 12 orificios de 2 mm de diámetro. 4: Soporte para el secado del papel filtro. 5: Sistema cerrado para generar vacío. 6: Bomba de vacío con manómetro para controlar la presión.



Fig. 3 *Traceable*^R. Dispositivo para medir humedad y temperatura.

Una vez que se seleccionó el flujo de aire con el que se trabajaría se realizó un análisis microbiológico (**AMb**) a una sección de 0.5 cm x 1.5 cm del centro del papel, específicamente de la región 5 de acuerdo a la *Figura 3* para conocer la concentración final de cada una de las diluciones después del secado. Se realizaron diluciones de 10^{-1} a 10^{-5} usando agua desionizada estéril como medio

diluyente. Se sembró por duplicado 1mL de las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} en agar APT por vertido en placa. Se incubó durante 48 horas a 29°C. Pasado este tiempo se cuantificaron las colonias, se sacó el promedio de las dos repeticiones y las dos diluciones y el resultado se dividió entre 1.1. De esta manera se obtuvo UFC/muestra a determinado tiempo de secado.

Habiéndose determinado la dilución, se verificó que el secado fuera total y homogéneo. Al papel de 10 cm x 15 cm seco se le realizó un muestreo microbiológico. Se dividió en nueve regiones que representan las diferentes posiciones dentro del secador (*Figura 3*). Se seleccionó una muestra de 0.5 cm x 1.5 cm del centro de cada una de las regiones para considerarse representativo y se realizó un AMb a cada una de ellas.

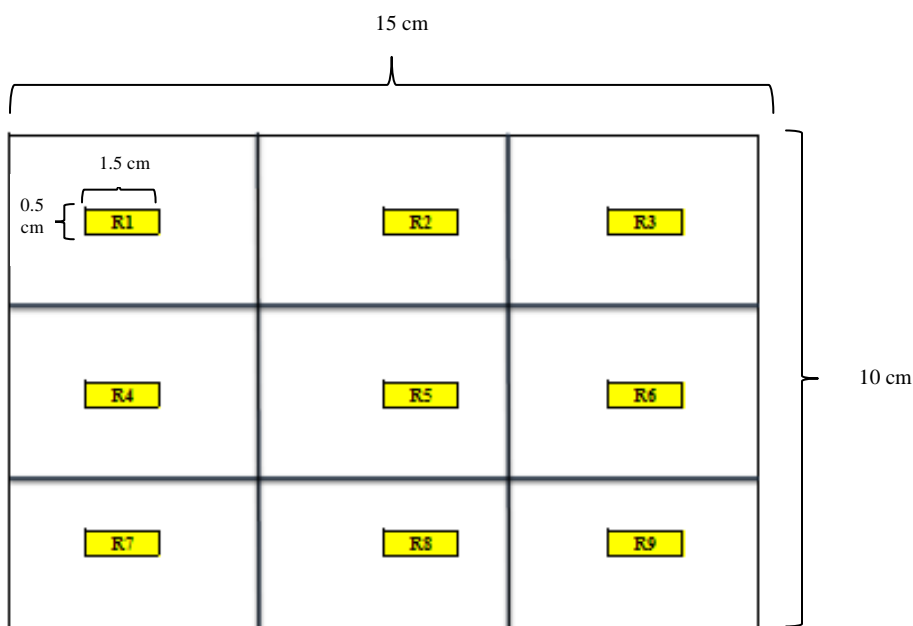


Fig. 3: Distribución de las 9 regiones (R1-R9) en papel filtro industrial de 10 cm x 15 cm. Muestreo microbiológico a secciones de 0.5 cm x 1.5 cm del centro de cada una de las regiones.

El valor final se reporta como viabilidad de bacterias después del secado (UFC) por muestra de 0.5cm x 1.5cm.

Los papeles secos de 10 cm x 15 cm se cortaron en papelitos de 0.5 cm x 1.5 cm y se almacenaron a 4°C.

3.4 Influencia de la humedad en la viabilidad de bacterias.

Una vez impregnado, se pesó el papel filtro antes de ser colocado en el secador y se pesó cada 10 minutos para el caso de secado con aire (80 L/min) y cada 30 minutos con el secado con vacío y aire (20 kPa, 6 L/min) para monitorear la cantidad de agua perdida. El secado en cada uno de los puntos fue ininterrumpido. Paralelamente, durante los mismos intervalos, se cuantificó la cantidad de bacterias viables mediante un análisis de microbiológico de una muestra de 0.5 cm x 1.5 cm, región 5 de la *Figura 3*. Se realizó un AMb y de esta manera se obtuvo UFC/muestra a determinado tiempo de secado.

3.5 Impregnación y secado de resazurina.

Se preparó una solución de resazurina 0.0065%(v/v), partiendo de una solución madre de 0.05% (m/v)- *Sigma Resazurin, R-2127, lot.42H3621-*. Se vertió sobre una charola de acero inoxidable previamente sanitizada con alcohol.

Se impregnaron con la solución papeles filtro Wathman No. 4 de 10 cm x 15cm. y se retiró el exceso de solución. Los papeles húmedos se colocaron en el secador PPG (*Figura 1*) durante 20 minutos, con un flujo de 80 L/min.

Los papeles secos se subdividieron en papelitos de 0.5 cm x 1.5 cm y se almacenaron a 4°C, en cajas de cartón cubiertas con aluminio protegidos de la luz.

3.6 Funcionamiento de *Biosensor R y L^{MR}*

En el interior de un popote de polipropileno se colocó una muestra de 0.5 cm x 1.5 cm de papel filtro industrial impregnada de bacterias lácticas secas y encima un papelito de las mismas medidas impregnada con resazurina.

Se agregaron 500 µL. de agua desionizada estéril para activar el funcionamiento.

El popote se selló por los extremos, *Figura 4*.

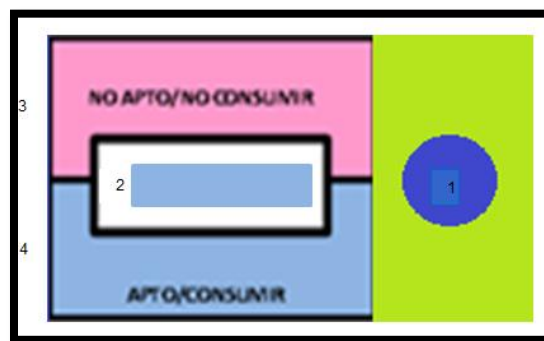


Fig. 4: Presentación del *Biosensor R y L^{MR}*. Donde 1: Compartimiento con agua estéril, 2: Compartimiento de polietileno con una tira impregnada de bacterias lácticas y una tira impregnada con resazurina, 3 y 4: Colores de interpretación.

La *Figura 5* indica como debe activarse el *Biosensor R y L^{MR}*, para monitorear el alimento deseado. La *Figura 6* muestra el empaque de almacenamiento.

Instrucciones:

1. Tome un *Biosensor^{MR}* teniendo cuidado de no ejercer presión sobre el punto azul.
* Verifique que la tira colocada en el *Biosensor^{MR}* se encuentre en color azul (en caso contrario tome otro *Biosensor^{MR}*).
2. Active el *Biosensor R y L^{MR}* ejerciendo presión sobre el punto azul para romper la burbuja que contiene agua.
3. Retire la película color verde que se encuentra en la parte de atrás del dispositivo y pegue el *Biosensor R y L^{MR}* en el alimento que desee monitorear.
4. Antes de consumir el alimento verifique la coloración final que presente el *Biosensor R y L^{MR}*.

AZUL=APTO PARA CONSUMIR/ROSA= NO APTO PARA CONSUMIR

**Si se mantiene el alimento en refrigeración el cambio de coloración se verá en 4 días. A temperatura ambiente será en 4 horas.*

Fig. 5. Instructivo de *Biosensor Ry L^{MR}*



Fig. 6. Punto de venta y empaque de almacenamiento de los *Biosensor R y L*

MR

Biosensor R y *L^{MR}* fue monitoreado a 4°C en intervalos de 24 horas y temperatura ambiente (23°C± 2°C) en intervalos de 1 hora hasta observar el cambio de color de azul a rosa.

3.7 Vida de anaquel.

Se verificó cada 15 días, durante dos meses, la viabilidad de las bacterias una vez fijadas en papel filtro y secas, y, almacenadas en refrigeración y en caja de cartón cubierto con aluminio (*Figura 6*). Se realizó un AMb una muestra de 0.5 cm x 1.5 cm de cada una de las nueve regiones. Se activó el *Biosensor R* y *L^{MR}* y se monitoreó a 4°C en intervalos de 24 horas y temperatura ambiente (23°C± 2°C) en intervalos de 1 hora hasta observar el cambio de color de azul a rosa.

4. Resultados y discusión.

4.1 Curva de crecimiento

La *Figura 1* nos muestra las características morfológicas que presentaron las bacterias: Gram positivas, agrupadas como cocos en cadena. Dado que la cepa se mantuvo en constantes resiembras durante los tres meses anteriores a su uso, ésta presentó un desarrollo y caracterización concordante con Del Castillo y Mestres (2004).

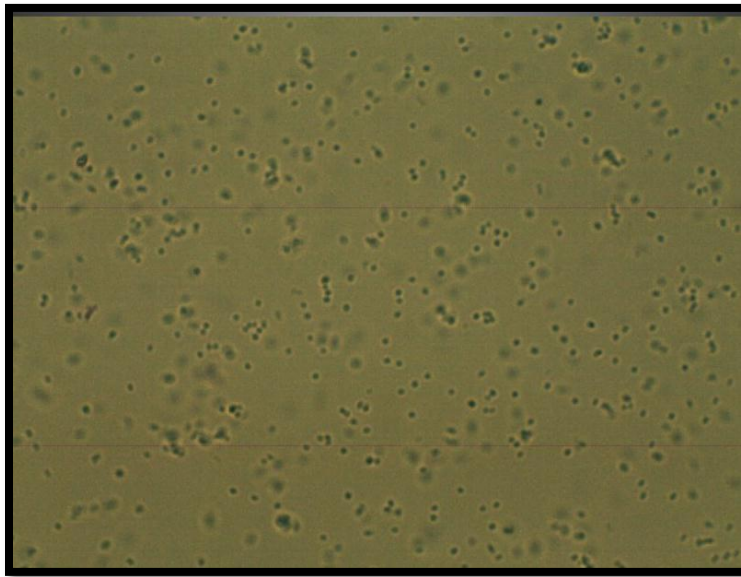


Fig. 1: Tinción Gram vista en microscopio óptico 1000x.

La *Figura 2* nos indica que el cultivo alcanzó la fase estacionaria alrededor de las 10 horas de incubación, presentando una población de 10^8 UFC/mL. Dicha información corresponde al experimento publicado por Valbuena (2005). Se puede

trabajar con cultivos de 12 a 24 horas de incubación. Tiempo suficiente para que se presente una cuenta microbiana que favorezca obtener la concentración deseada después del tratamiento de secado, así como bacterias en estado fisiológico que sobrevivan a dicho tratamiento y al almacenamiento de acuerdo a Sigala (2000).

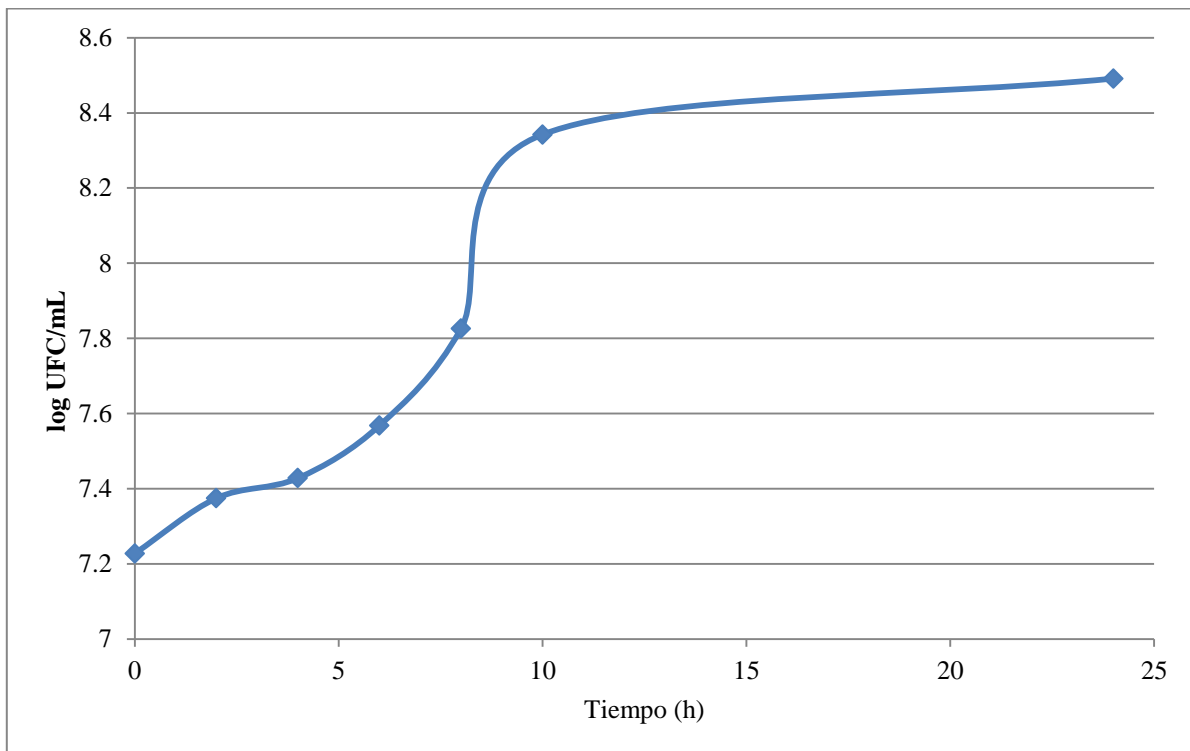


Fig 2. Curva de crecimiento de *L. lactis ssp lactis* en medio industrial.

4.2 Secado del material impregnado.

El Cuadro 1 muestra que el tiempo de secado menor se logra con los flujos de 80 L/min y 90 L/min. El caso del secado con vacío se hace de acuerdo a experiencias anteriores realizadas en el laboratorio.

Flujo de aire (L/min)	Tiempo (min)
30	170
36	75
65	65
80	40
90	35
Vacío (20KPa)	Tiempo (min)
6 L/min	180

Cuadro 1. Tiempo de secado para obtener 0% de humedad de un papel filtro de 10 cm x 15 cm empleando diferentes flujos de aire y condiciones de vacío.

El Cuadro 2 nos muestra que a 80 L/min y con una dilución de 1/19 con medio de dilución, se alcanza la concentración ideal determinada por Tafolla (2007), 1×10^5 bacterias, que permita el buen funcionamiento del *Biosensor R y L^M*.

Podemos notar que en el caso de 90 L/min, aunque el tiempo de secado es menor, la presión que se ejerce por el flujo de aire (200 mmHg), pudiera afectar a las células lo que se ve reflejado en las cuentas del orden de 10^4 bacterias que se obtienen en todas las diluciones.

Flujo de aire (L/min)	(A) UFC/Tira	(B) UFC/Tira	(C) UFC/Tira	(D) UFC/Tira	(E) UFC/Tira
79.83	1.1×10^5	9.6×10^5	4.3×10^4	5.9×10^5	6.4×10^4
88.23	1.0×10^4	8.6×10^4	5.2×10^4	3.4×10^5	9.2×10^3
Vacío (20KPa)/ 6 L/min	---	---	---	---	2.3×10^4

Cuadro 2. Concentración de bacterias por tira de 0.05 cm x 1.5 cm, después del secado (0% humedad). Donde (A) 1/19 con medio de dilución, (B) 1/10 con medio de dilución, (C) 1/10 con solución salina al 0.85%, (D) 1/10 con medio industrial y (E) 1/100 con medio de dilución.

Únicamente se obtiene una cuenta cercana a la ideal bajo el tratamiento de 90 L/min y dilución 1/10 con medio industrial, ya que la cantidad de sólidos presentes (11%) actúan probablemente con un efecto crioprotector de las bacterias que se intentan conservar en el papel filtro.

El tratamiento con vacío realizado en éste experimento presenta resultados diferentes a los obtenidos en el laboratorio en el 2010, los cuales correspondían con los reportados por Tafolla (2007) (Tafolla: desecador con vacío vs 2010: bomba de vacío). El tiempo de exposición afecta a las bacterias durante el tratamiento ya que en éste experimento el tiempo de secado es casi tres veces mayor al reportado en el experimento de Tafolla (2007) y a experiencias en el laboratorio (2010) esto causado por la diferencia en la superficie de secado (6 cm² de acuerdo a Tafolla vs 150 cm² en el presente experimento).

Los resultados indican que el secado a 80 L/min y una dilución de 1/19 con medio de dilución serán óptimos para el funcionamiento del *Biosensor R y L^{MR}*. En el caso de vacío 20 kPa y 6 L/min y una dilución de 1/100 con medio de dilución se continuarán para comparar los efectos entre un método y otro.

La posición de las secciones en cada una de las nueve regiones no afecta la viabilidad de las bacterias como se observa en la *Cuadro 3*, lo que nos indica que el diseño del secador permite un secado homogéneo independientemente de la posición.

El Cuadro 4 indica que la desviación estándar de los experimentos con secado con aire no se debe al tratamiento de secado en sí, sino a la técnica ya que existe un 20% de error en la cuenta por vertido en placa, que fue el método que se utilizó para llegar a estos resultados. Lo mismo ocurre con el tratamiento de secado al vacío.

Sin embargo si existe diferencia entre la cantidad de bacterias final comparando los dos métodos: vacío y aire, causado por el tiempo de exposición al tratamiento de secado.

La concentración en cada región con el secado al vacío es un logaritmo menor a la de secado con aire en las 9 regiones.

1.1×10^5 4.3×10^4	9.1×10^4 1.8×10^4	9.1×10^4 1.6×10^4
9.3×10^4 1.0×10^4	1.8×10^5 1.8×10^4	1.4×10^5 2.3×10^4
9.8×10^4 5.6×10^4	9.5×10^4 1.6×10^4	1.1×10^5 1.4×10^4

Cuadro 3: Cuenta microbiana de bacterias por tira de 0.5 cm x 1.5 cm en cada región después del secado. Donde el azul indica la cuenta con secado con aire 80 L/min y el rojo la cuenta con secado al vacío 20 KPa, 6 L/min.

Región	No. De bacterias viables (80 L/min)	No. De bacterias viables (20 KPa, 6 L/min)
Promedio	1.12×10^5	2.4×10^4
DE	2.9×10^4	1.5×10^4

Cuadro 4. UFC/ tira (0.5 cm x 1.5 cm) en diferentes regiones.

En experimentos anteriores (2010), se realizó el secado de la misma cepa de manera vertical y utilizando vacío y aire en diferentes combinaciones. El primer problema que surgió en su técnica fue la posición de los papeles ya que al ponerse en posición vertical se generaban un gradiente el cual concentraba a las bacterias en uno de los extremos, esta técnica fue modificada en este proyecto al colocarlos de manera horizontal y sobre una placa que permita que el flujo de aire seque toda la superficie homogéneamente.

4.3 Influencia de la humedad en la viabilidad del secado

De acuerdo a la *Figura 3* se percibe que la pérdida de humedad conforme transcurre el tiempo empleando flujo de aire se realiza en un menor tiempo en comparación con el secado con vacío el cual tarda casi tres veces más para llevarse a un secado total.

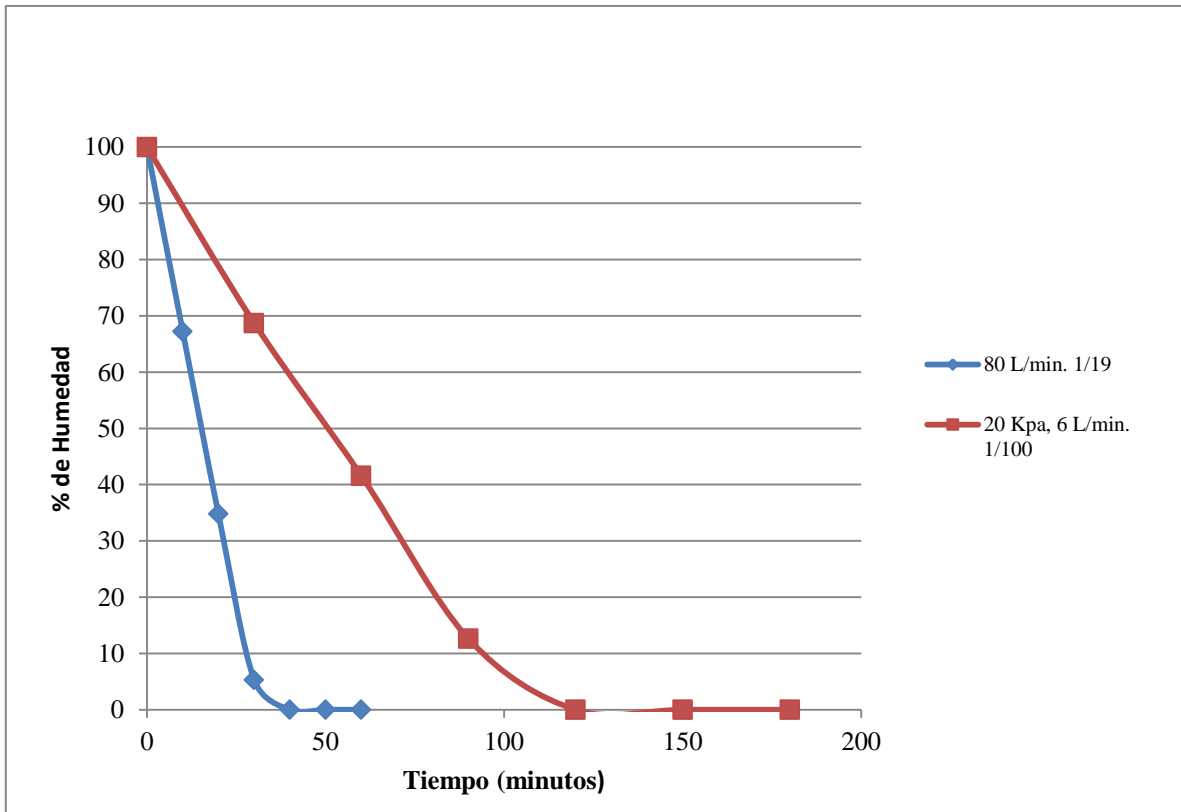


Fig. 3: Gráfico de pérdida de agua durante el secado en condiciones de vacío y flujo de aire

En la *Figura 4* podemos observar la relación entre la viabilidad de las bacterias y tiempo, con el secado al vacío disminuye hasta el orden de 1×10^4 bacterias. Para obtener la concentración deseada, 1×10^5 bacterias, sería necesario secar al vacío únicamente durante 60 minutos, lo cual resultaría contraproducente debido a que a ese tiempo el papel filtro presenta 42% de humedad y si se llegaran a almacenar con ese contenido de agua, las reacciones metabólicas continuarían durante el almacenamiento.

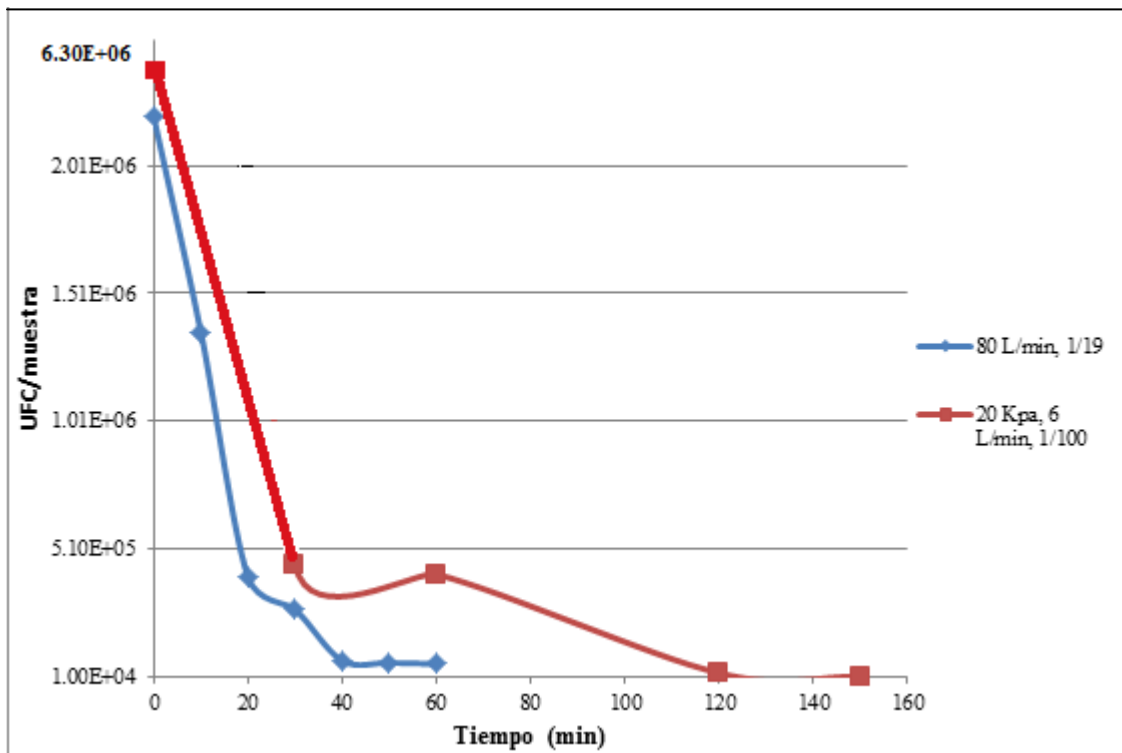


Fig. 4: Viabilidad de bacterias en tira de 0.5 cm x 1.5 cm durante el secado en condiciones de vacío y flujo de aire.

La *Figura 4* también nos indica que no existe el punto crítico donde se suponía una muerte considerable a determinado tiempo, sino que podemos ver que conforme disminuye la cantidad de agua disponible, las bacterias mueren hasta llegar a una cuenta que se mantiene constante en ambos casos (aire y vacío).

Éstas son bacterias resistentes al secado. Se sugiere una hipótesis para explicar la muerte por deshidratación, la cual contempla que las bacterias que fueron incubadas se encuentran en diferentes estados fisiológicos. Estas células son impregnadas en el papel filtro y al ser secadas las más vulnerables son las que mueren primero por lo que las bacterias vivas quedarían en un estado más homogéneo. Las células muertas se van aglomerando alrededor de las vivas protegiéndolas de tratamiento al que siguen siendo expuestas evitando así el daño

o la muerte de acuerdo a la *Figura 5*. De tal manera que una deshidratación rápida provoca una muerte lenta y viceversa por lo que se observan cuentas mayores en el tratamiento de secado con aire a 80 L/min.

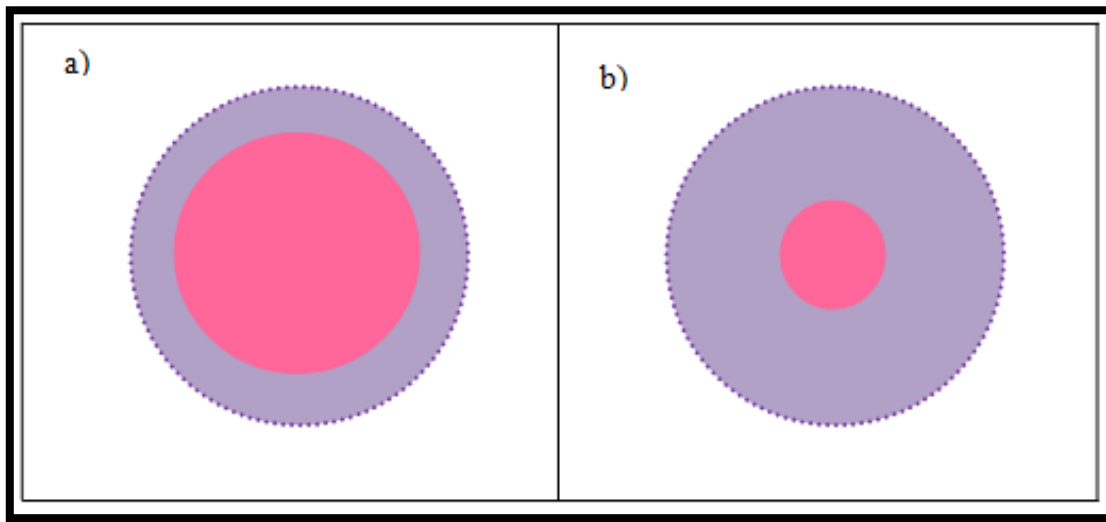


Fig. 5: Muerte por secado, donde ● bacterias vivas y ● bacterias muertas. a) Secado rápido y b) Secado lento.

Al eliminar toda el agua, el papel filtro (celulosa) permite el soporte de la bacteria debido a las fibras que el mismo papel presenta y a las cuales puede adherirse la bacteria de acuerdo a Negroni (2009).

La *Figura 6* nos muestra el porcentaje de la muerte de los microorganismos con respecto a la técnica de secado y relacionándolo con la *Figura 4* podemos notar que la muerte de los microorganismos con el secado a un flujo de 80 L/min de aire es de 97%. No se observa una destrucción decimal como se tiene referencia de la destrucción térmica, donde por efecto de la temperatura, puede observarse la disminución logarítmica de los microorganismos presentes en determinado tiempo como explica Orrego (2003) pero éste método de disminución microbiana asegura

que los microorganismos presentes, seguirán latentes y al momento de rehidratarse volverán a ser viables. Sin embargo en el caso del secado al vacío a 20 kPa y 24 L/min la destrucción es de del 99.85%, esta reducción es causada por el tiempo de exposición al secado, ya que como se mencionó el tiempo de secado con vacío es superior al secado con aire debido a que el flujo de aire se ve reducido con el vacío y la cantidad de agua que puede retirarse es menor.

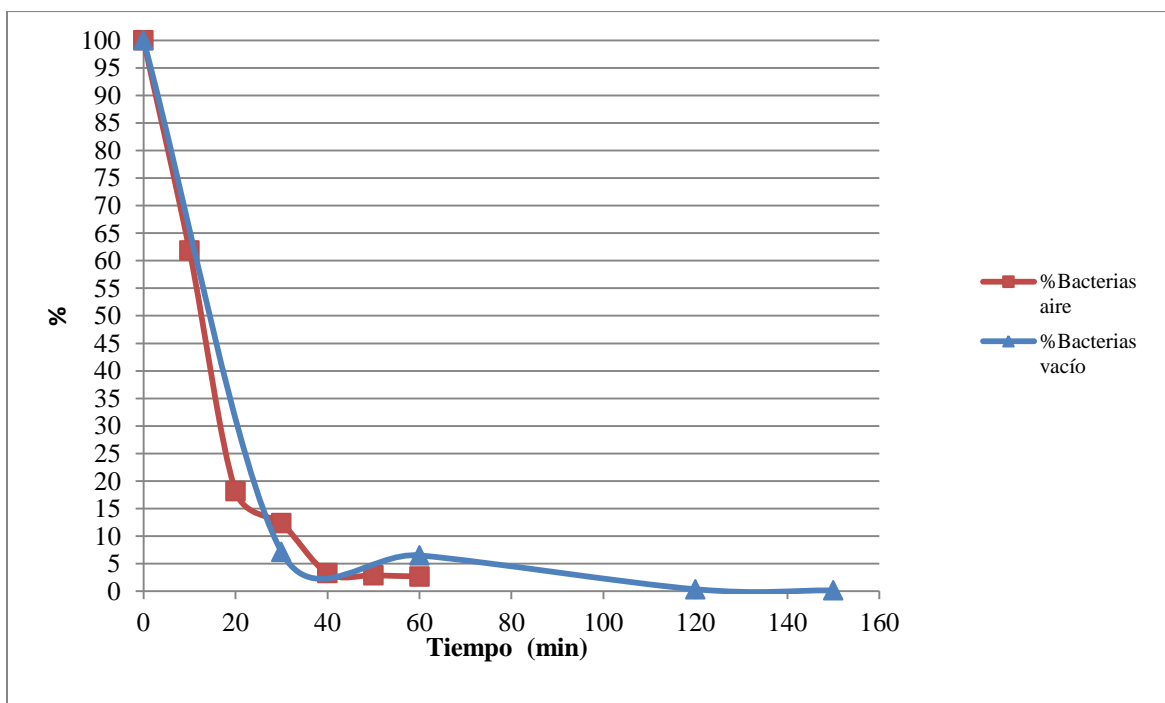


Fig. 6: Influencia del secado en la viabilidad de bacterias.

El tiempo de secado en experimentos anteriores refieren 50 minutos, secarse una superficie menor, también la mortalidad de las bacterias fue del 90%. Dicho valor que concuerda con la cuenta final obtenida con el secado con aire: 1×10^5 , El uso de aire favorece el secado en menor tiempo, y sin destrucción adicional de

bacterias fijadas, además, resulta ser un método más sencillo y accesible de operar.

El uso de aire seco y estéril con un flujo constante, permitió la reproductibilidad de todas las pruebas de manera satisfactoria, al obtener la concentración ideal de bacterias que permite visualizar el cambio en tiempos proporcionales tanto a temperatura ambiente como en refrigeración. Asimismo, se obtuvo sin necesidad de diluciones adicionales que pudieran presentar un riesgo de contaminación de la cepa, la concentración ideal por tira propuesta por Tafolla (2007).

Finalmente, aplicando el método de secado con aire, que es con el que se trabajará a nivel industrial, se necesitan 125 mL de medio industrial filtrado (incubado de 12-24 horas) y 2250 mL de medio de dilución para obtener 500,000 tiras que es la cantidad diaria que se pretende producir.

4.4 Impregnación y secado de resazurina.

La concentración de resazurina que nos permitiera observar un cambio en el color azul a rosa de manera “rápida” a temperatura ambiente, 4 horas, y “tardía” en refrigeración, 4 días, se obtuvo al impregnar papel filtro Wathman No. 4, de 10 cm x 15cm con una solución 0.0065%, la cual presentaba una coloración correspondiente al azul PMS 277 de acuerdo al PANTONE, después del secado con aire. El secado con aire requiere de una concentración ligeramente mayor, con respecto a la que sugiere Jiménez (2011) -el cuál indicó que era de 0.005% secando en vacío absoluto- debido a la degradación de la resazurina con el aire.

Las especificaciones de la resazurina (marca, pureza, contenido de humedad) fueron cruciales para obtener el resultado deseado, así como el tipo de papel; ya que el empleado para estas pruebas permite, de manera eficaz obtener: el secado en menor tiempo y la coloración adecuada para observar los cambios necesarios del *Biosensor R* y *L^{MR}*.

El secador empleado para las tiras de resazurina puede ser el mismo que se emplea para el secado de bacterias, dado que se utiliza el mismo flujo. Únicamente se debe lavar y sanitizar la base del secador para evitar que el papel con resazurina presente irregularidades causadas por las bacterias que queden en la superficie, ya que al ser colocar el papel húmedo el agua presente llega a activar a las bacterias secas provocando que se presenten manchas rosas que afectan la calidad de los papeles de resazurina e interfieren con la interpretación del *Biosensor R* y *L^{MR}*.

4.5 Funcionamiento del *Biosensor R* y *L^{MR}*.

La *Figura 7* nos indica que el dispositivo cambia de color azul a rosa en 4 horas (monitoreado cada hora) correspondiente a la Patente (170279), UNAM: Equipo para determinar la calidad microbiológica de la leche y procedimiento para emplearlo y a experimentos realizados por Tafolla (2007). Este cambio de color nos indica que se ha roto la cadena de frío, al menos durante éste tiempo a una temperatura de $23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$. De esta manera se ha activado el metabolismo de las

bacterias en los papelitos y el gradiente de protones que este genera comienza las reacciones de reducción en la resazurina ocasionando el cambio de color. El *Biosensor R* y L^{MR} indica que ha sufrido un cambio de temperatura y que por lo tanto al observarse la coloración rosa ya no es recomendable consumir el alimento en el cual se ha instalado el dispositivo, ya que, de acuerdo a experimentos que realizó Jiménez (2011), la carga microbiana a esta temperatura, en específico las bacterias mesófilas que se encuentren presentes pueden llegar a aumentar entre 3 y 5 logaritmos su concentración volviendo peligrosa la ingesta del alimento.

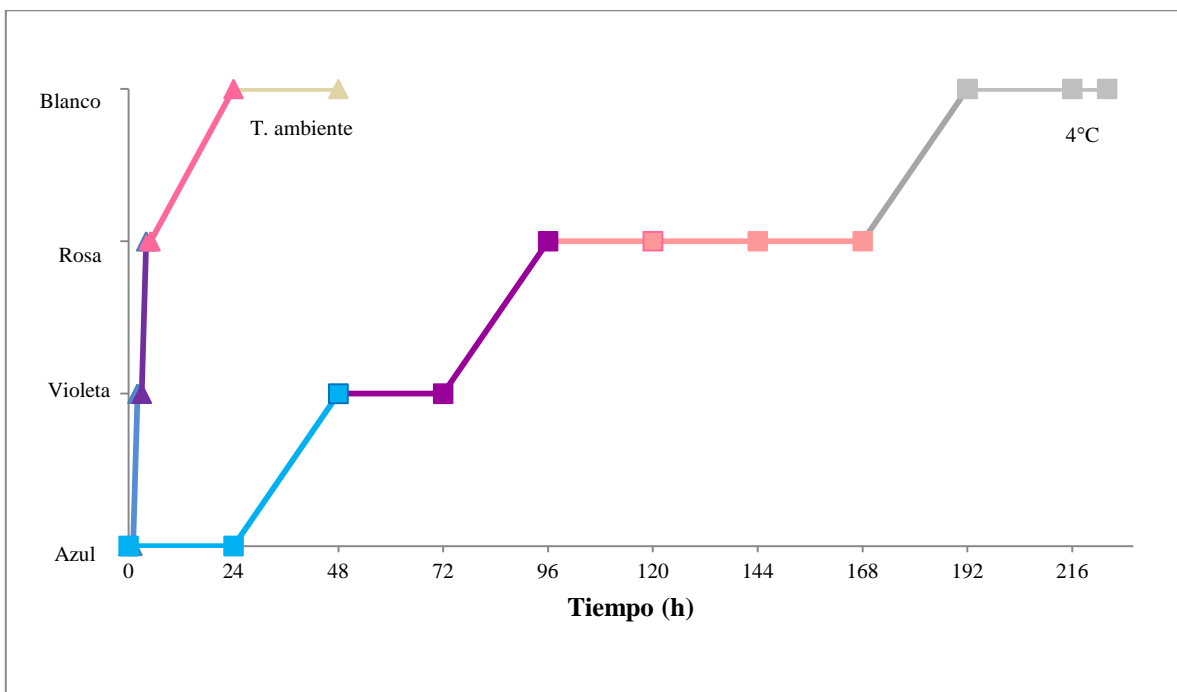


Fig. 7: Cambio de color del *Biosensor R* y L^{MR} (Funcionamiento) monitoreado a temperatura ambiente y temperatura de refrigeración.

De igual manera las características sensoriales del alimento se ven afectadas con la temperatura en periodos largos por lo que el producto no será como inicialmente se adquirió.

Igualmente puede notarse el cambio de color, de azul a rosa pero a temperatura de refrigeración (4°C). La temperatura óptima de la bacteria es de 29 °C por lo que a 4°C el metabolismo de *Lactococcus* disminuye su velocidad y el vire de color puede observarse hasta los 4 días (monitoreado cada 24 horas). La cadena de frío sin ser interrumpida puede mantener el alimento en óptimas condiciones hasta el momento de su consumo. Una semana es el tiempo máximo que se recomienda tener en refrigeración los alimentos para poder ser consumidos con una calidad similar a la que fueron adquiridos de acuerdo a Pascual (2005).

La *Figura 7* nos muestra como el manejo correcto de los alimentos aumenta su vida útil y que es un buen indicador de que existió un cambio de temperatura. Si bien la manipulación del alimento cumplió en todo momento con la temperatura de refrigeración (4°C) el cambio de color nos indicará cuánto tiempo lleva almacenado lo que permitirá monitorear los alimentos y así saber el momento en el que presentan la mejor calidad para ser consumidos.

4.6 Vida de anaquel.

Los resultados arrojados con el monitoreo de vida de anaquel en la *Figura 8* muestran que la viabilidad de las bacterias disminuye un 80% en el primer mes y se mantiene en esos valores, al menos, durante dos meses, almacenados a 4°C. Estos resultados son consistentes con los reportados por Tafolla (2007) quién indica que partiendo de una concentración de 1×10^5 de bacterias secas disminuye al orden de 1×10^4 después de dos meses de almacenamiento. Esta será la

temperatura de almacenamiento que se sugiere en la planta de producción y durante su distribución ya que se pueden mantener viables a los microorganismos durante un mayor tiempo y sin presentar ninguna señal de actividad metabólica debido también a la ausencia de agua en las el material absorbente.

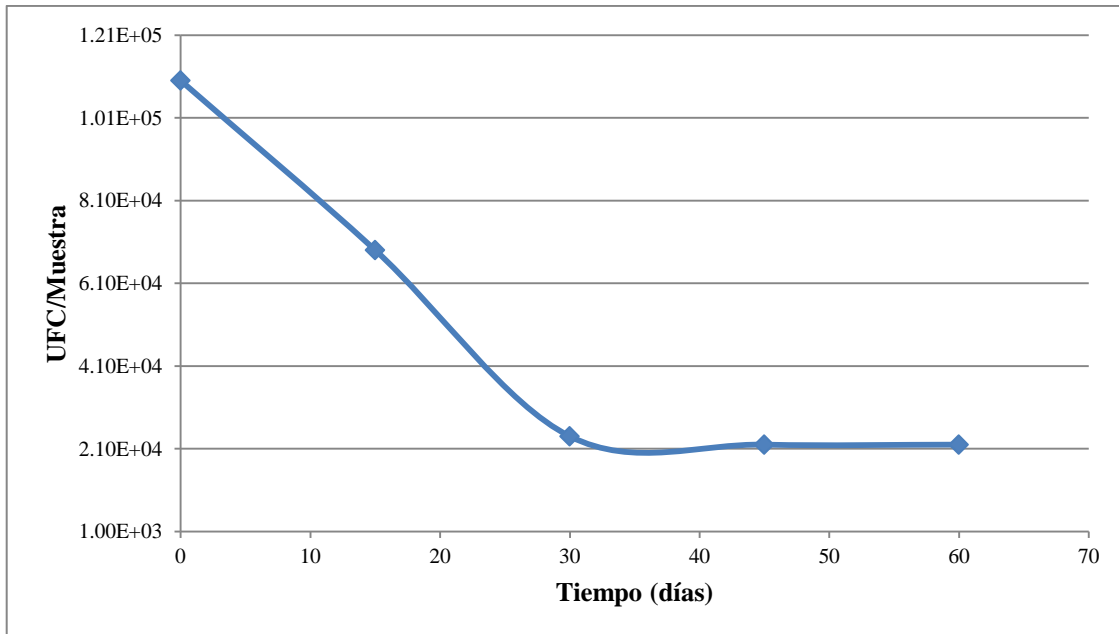


Fig. 8: Promedio de la viabilidad de 9 muestras en las 9 regiones durante su almacenamiento a 4°C.

La *Figura 9* nos indica el funcionamiento del *Biosensor R* y *L^{MR}*, después de activarlo, durante su almacenamiento. Los cambios de color a las dos temperaturas monitoreadas son los mismos que el observado al tiempo cero (inmediatamente después del secado y ensamblado del *Biosensor R* y *L^{MR}*). Los resultados indican que con cuentas de 10^4 se obtiene el mismo resultado por lo que la cuenta inicial deberá ser verificada para evitar que sea menor y así se pierda la funcionalidad del dispositivo.

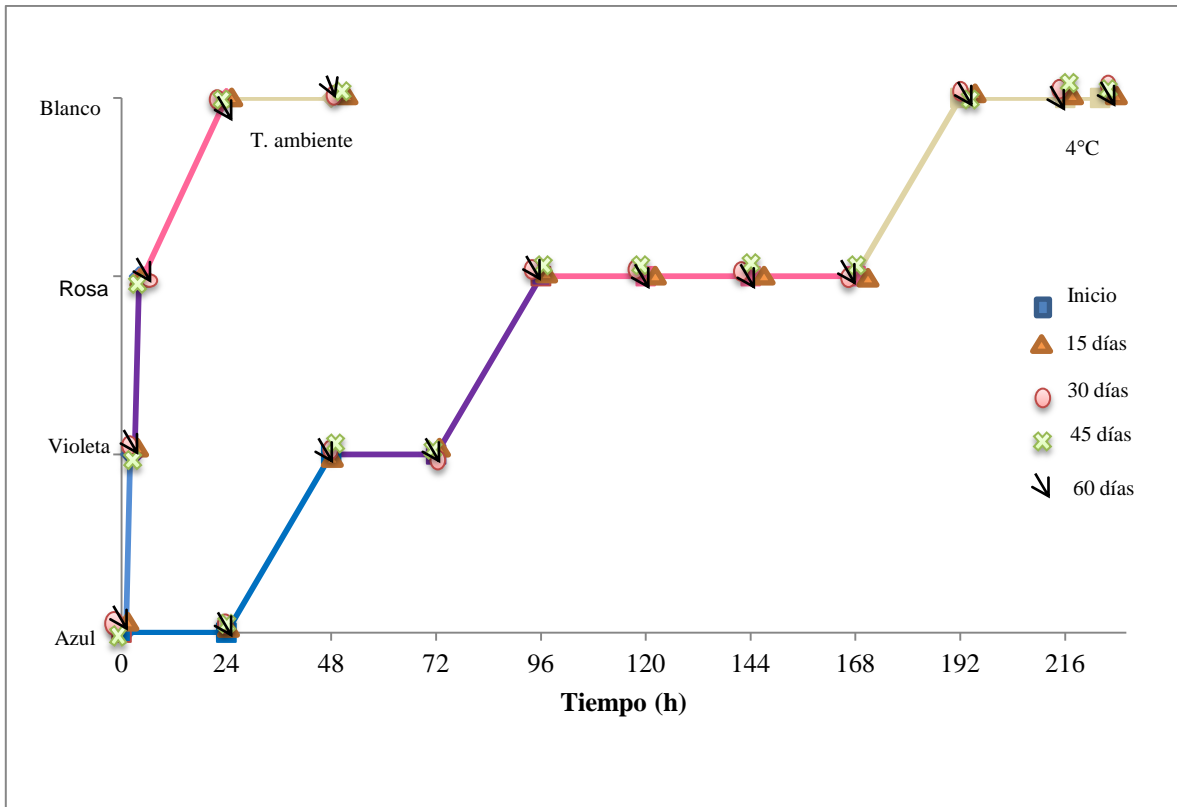


Fig. 9: Gráfica del viraje de resazurina, después de activado el *Biosensor R* y *L^{MR}* a temperatura ambiente (23-26°C) y a 4°C. Durante almacenamiento a 4°C, protegido de la luz.

Dos meses es el mínimo tiempo que se puede garantizar el funcionamiento óptimo del *Biosensor R* y *L^{MR}*, es un tiempo adecuado que permite comercializar el *Biosensor R* y *L^{MR}* antes de ser utilizado por el consumidor. Se deberá tener control sobre la temperatura de almacenamiento ya que la temperatura es un factor que provoca la muerte de las bacterias, afectando el funcionamiento del *Biosensor R* y *L^{MR}*. Tal como reporta Tafolla (2007) al monitorear la viabilidad de bacterias a temperatura ambiente. Es importante que el almacenamiento se lleve a cabo en un contenedor protegido de la luz para evitar la degradación de la resazurina la cual es fotosensible.

5. Conclusión

Se logró desarrollar y optimizar el funcionamiento del *Biosensor R* y *L^{MR}*. La producción consiste en:

Material absorbente para fijar bacterias:

- ✓ Impregnar en papel filtro industrial células de *L. lactis* con una dilución 1/19 (1 mL de cultivo de *L. lactis* -activo en medio industrial- en 19 mL de medio de dilución sin esterilizar).
- ✓ Secar con aire seco y estéril con flujo constante de 80 L/min durante 40 minutos.

Material absorbente con resazurina:

- ✓ Impregnar papel filtro Wathman no.4 con una solución de resazurina 0.0065% (v/v).
- ✓ Secar con aire seco y estéril con flujo constante de 80 L/min durante 20 minutos.

Al poner en contacto las dos tiras de 0.5 cm x 1.5 cm (uno sobre de otro) y activar el kit con 500 μ L de agua estéril se puede observar un cambio en la tira de

resazurina, de azul a rosa, en 4 horas a temperatura ambiente ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) y 96 horas en refrigeración ($4^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$).

Una vez ensamblado el *Biosensor R* y *L^{MR}*, y sin ser activado, el dispositivo tiene una vida de anaquel de 2 meses (como mínimo), almacenado a 4°C , 0% Hr y protegido de la luz, para observar el mismo comportamiento en el cambio de color del indicador.

6. Bibliografía.

Armenta R., Guerrero-Legarreta I., Huerta S. 2002. *Extracción de caropoteínas a partir de residuos de camarón fermentados*. Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol. 1 No 2. P.p:49-55.

Aznar R.2 y Zúñiga M, *¿Qué son las bacterias lácticas?* Dpt. Biotecnología de Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC). Dpto. Microbiología y Ecología. Fac. C. Biológicas. Univ. Valencia.

Consejo Argentino para la información y el desarrollo de la Biotecnología. 2007 [En línea] (Actualizado en Junio 2007).

Disponible en: *Las bacterias ácido lácticas en la industria alimenticia. La biotecnología*. <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades¬e=190> (Último acceso el 14 de Agosto del 2012.)

Del Castillo R, Mestres J., *Productos lácteos, tecnología*.2004. Catalunya. Ediciones UPC.

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

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

Dirección de Promoción de Exportaciones. 2010.[En línea](Actualizado en Mayo, 2010).

Disponible en: *Hábitos de compra del consumidor*.

http://www.prochile.cl/newsletters/habitos_europa_2006/6_madrid_habitos_compra.php.

(Último acceso el 20 de Julio del 2012).

Escobar Antoine Claudio Manuel. 2009. *Estudio de la reducción de azufre elemental y reducción de Sulfuro de hidrógeno en bioreactores anaeróbicos*. Tesis doctorado. Santiago de Chile. Universidad de Chile.

Gómez M., Degradación de péptidos hidrófobos por bacterias lácticas. Aplicación en la eliminación del sabor amargo en queso. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense De Madrid. España.

Greenfield, H. y Southgate.2003. *Datos de composición de alimentos. Obtención, gestión y utilización*. 2ª. edición. Roma. Elsevier Science Publishers.

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

Hernández A, Alfaro I., Arrieta R.; 2003. *Microbiología industrial*. Costa Rica, EUNED.

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

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

Jiménez T; Pérez- Gavilán P; Ortiz M., 2011. *Uso de un Kit hecho a base de bacterias lácticas y resazurina para determinar la calidad microbiológica de los alimentos perecederos*, Mundo HVACR. Año VII .Núm 77.P. p: 50-56

Kandler O. 1983. *Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria*. Antonie van Leeuwenhock 49. P.p.: 209-224. Moscú.

Konings W., Kuipers O. y Huis in't Veld J. 2004. *Lactic acid bacteria: Genetics, metabolism, and applications*. Netherlands. Kluwer Academic Publisher.

Levaeu, J., Bouix, M.,2000. *Los microorganismos de interés industrial*. Zaragoza. Acribia.

Madigan T., Martinko J., Parker J., 2004. *Brock Biología de los microorganismos*. 8a edición. España. Prentice Hall.

Milena S., Suárez H. Y Zapata S. 2009. *Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne*. Rev Chil Nutr Vol. 36, Nº1. P.p: 64-72.

Morales Y., Duque E., Rodríguez-Andrade O, De la Torre J., Martínez R., Pérez y Terrón R. y Muñoz J. 2010. *Bacterias Preservadas, una Fuente Importante de Recursos Biotecnológicos*. BioTecnología, Vol. 14 No. 2 11 P.p:16-21.

Moreno C. Envasado inteligente: *Empaque performance*. *La Revista Mexicana del Empaque, Envase, Embalaje y Plásticos*, 339.

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.

Negrón M. *Microbiología lactológica*. 2009. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana.

Orrego C, *Procesamiento de alimentos*, 2003. Manizales. Universidad Nacional de Colombia.

Pascual R. *Enfermedades de origen alimentario*. 2005. España. Díaz de Santos S.A.

Pérez- Gavilán EJ. 2012. *Dispositivo para vigilar la cadena en frío de productos biológicos y su proceso de producción*. Patente en trámite, UNAM, México.

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

Plank R., *El empleo del frío en la industria de la alimentación*. 2005. Berlin. Reverte.

Rapin R., Jacquard P., *Formulario del frío*. 1996. París, Marcombo, Boixareu editores.

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

Schneider R.; 2007. *Aplicación de bacteriocinas en el control de la contaminación de la carne*, NACAMEH, Vol.1 No.1. P.p:41-52.

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

Sigala J., Tafolla M., Pérez-Gavilán P. 2007. *Estudio de la Actividad Ácido Láctica de Lactococcus lactis ssp. lactis y su Relación con el Perfil de Plásmidos Durante el Almacenamiento en Refrigeración*. BioTecnología, Vol. 11 No. 2. P.p:23.

Suministros Riol S.A. 2012. [En línea]. (Actualizado en Enero, 2012).

Disponible en: *Control de la cadena de frío*.

<http://www.surisa.es/chillchecker.html>. (Último acceso el 20 de Julio del 2012).

Tafolla M, 2007. *Uso de las bacterias láctica y resazurina para monitorear la cadena de frío de productos perecederos*. Tesis de licenciatura, UNAM, México.

Tórtora G., Funke R. y Case, L, 2007. *Introducción a la microbiología*. 9ª. edición. Buenos Aires. Editorial panamericana.

Yang R., Johnson MC. y Ray B. 1992. *Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria*. Appl. Environ. Microbiol. (10):3355.

3M, México. 2012.[En línea](Actualizado en Enero, 2012).

Disponible en: *Monitoreo de Tiempo/Temperatura:*

http://solutions.3m.com.mx/wps/portal/3M/es_MX/FSD_LA/FoodSafety/product-information/product-catalog/?PC_7_RJH9U5230GUIE0IHTB4RIT0SH6000000_nid=71PHMRZCJCbeX2JZNTZSLTgl.

(Último acceso el 20 de Julio del 2012).

7. Apéndice

COFEPRIS ha clasificado a los alimentos en tres categorías: Perecederos, no perecederos y cárnicos. La aplicación de *Biosensor R* y L^{MR} en alimentos perecederos y cárnicos ve una posibilidad de implementación como obligatorio ya que dicha invención ayudaría a monitorear la vida de anaquel de éstos alimentos al ser manipulados a temperatura ambiente ($23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) y en temperatura de refrigeración ($4^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$).

La Ley general de salud en el Artículo 25, la Fracción VII contempla la fecha de caducidad como elemento más importante en el etiquetado, y en el Artículo 266 para la fracción anteriormente mencionada indica una sanción de cinco a diez mil días de salarios mínimos en caso de no cumplirse con dicha especificación.

El uso del *Biosensor R* y L^{MR} en alimentos perecederos, lo cual ya ha sido probado, podrá ayudar al consumidor a verificar la vida útil de los productos adquiridos y podrán comparar si corresponde a lo que los proveedores reportan. El kit, de manera sencilla, ayudará a los consumidores a conocer si se cuenta con un alimento microbiológicamente seguro.

Para el consumidor será más fácil interpretar el cambio de color que indica si el alimento que compró es seguro y puede consumirse con base a las bacterias que

estén presentes en él. En el momento que los consumidores monitorean la calidad de sus alimentos se verán involucrados e interesados en la integridad de los mismos y querrán siempre consumir alimentos frescos que no sean riesgosos. Por lo que podrán pedir a sus proveedores que el *Biosensor R* y L^{MR} sea parte de su empaque para que así puedan comprobar vida de anaquel y calidad microbiológica.