

# DISEÑO DE UN PROTOTIPO DE INTEGRADOR DE TIEMPO TEMPERATURA PARA EL MONITOREO DE LA CALIDAD DE LECHE REFRIGERADA

---

FRANCISCO JAVIER GARCÉS VEGA

UNIVERSIDAD DE LA SABANA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS  
CHÍA  
2012

# DISEÑO DE UN PROTOTIPO DE INTEGRADOR DE TIEMPO TEMPERATURA PARA EL MONITOREO DE LA CALIDAD DE LECHE REFRIGERADA

---

FRANCISCO JAVIER GARCÉS VEGA

Directora:  
Bernadette Klotz Ph.D

Documento presentado para optar por el título de:  
Master en Diseño y Gestión de Procesos

UNIVERSIDAD DE LA SABANA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS  
CHÍA  
2012

*Agradecimientos a:*

*El Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias y al Fondo de Investigación de La Universidad de La Sabana por el apoyo económico para la realización de este proyecto.*

*La Facultad de Ingeniería de la Universidad de La Sabana por el apoyo a través de la asistencia graduada.*

*“La Universidad de La Sabana no se hace responsable por las opiniones contenidas en el presente documento que son exclusiva responsabilidad del autor”*

## TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	OBJETIVOS.....	3
2.1	OBJETIVO GENERAL.....	3
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3	ESTADO DEL ARTE .....	4
4	MARCO TEÓRICO .....	8
4.1	LA LECHE .....	8
4.1.1	CARACTERÍSTICAS Y PROCESOS DETERIORATIVOS DE LA LECHE .....	9
4.1.2	PASTEURIZACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LA LECHE .....	11
4.2	MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA .....	12
5	MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
5.1	BACTERIAS INDICADORAS Y PREPARACIÓN DEL INÓCULO.....	16
5.2	LA LECHE .....	16
5.3	RECUENTO DE BACTERIAS.....	16
5.3.1	RECUENTO DE FLORA TOTAL EN LECHE .....	16
5.3.2	RECUENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICA .....	17
5.4	SELECCIÓN DEL INDICADOR DE pH Y EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LAS BACTERIAS AL INDICADOR DE pH .....	17
5.5	EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA BACTERIA INDICADORA .	17
5.6	CINÉTICA DE DETERIORO DE LA LECHE .....	17
5.7	CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS INDICADORAS.....	18
5.8	CINÉTICA DE CAMBIO DE COLOR DEL INDICADOR.....	18
5.9	DESCRIPCIÓN DE LAS CINÉTICAS DE CRECIMIENTO MICROBIANO .....	18
5.10	VALIDACIÓN DEL MODELO.....	19
5.10.1	PARÁMETROS DE DESEMPEÑO.....	19
5.10.2	VALIDACIÓN INTERNA.....	19
5.10.3	VALIDACIÓN EXTERNA .....	20
6	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	21
6.1	SELECCIÓN DE LOS COMPONENTES ESTRUCTURALES DEL TTI .....	21

6.1.1	ESTANDARIZACIÓN DE LOS INÓCULOS .....	21
6.1.2	SELECCIÓN DEL INDICADOR DE pH .....	21
6.1.3	EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS EN MRS ADICIONADO CON LOS INDICADORES pH .....	22
6.1.4	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS.....	23
6.2	OBTENCIÓN DE MODELOS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO Y DE RESPUESTA DEL INDICADOR 24	
6.2.1	MODELO DEL CRECIMIENTO DE LA MICROFLORA PRESENTE EN LECHE PASTEURIZADA A DIFERENTES TEMPERATURAS .....	24
6.2.2	VALIDACIÓN DEL MODELO DE CRECIMIENTO PARA DETERIORO DE LA LECHE.....	29
6.2.3	MODELO DEL CRECIMIENTO DE LA CEPA COMPONENTE DEL INDICADOR A DIFERENTES TEMPERATURAS .....	30
6.2.4	VALIDACIÓN DEL MODELO DE CRECIMIENTO PARA EL INDICADOR.....	32
6.2.5	MODELO PARA EL CAMBIO DEL pH DEL INDICADOR.....	32
6.2.6	MODELO PARA EL CAMBIO DE COLOR A PARTIR DEL pH DEL INDICADOR.....	34
6.2.7	AJUSTE DEL INÓCULO INICIAL DEL INDICADOR PARA UNA RESPUESTA ADECUADA	34
6.2.8	RELACIÓN ENTRE EL CRECIMIENTO DE LA FLORA MICROBIANA EN LECHE PASTEURIZADA Y LA RESPUESTA DEL INDICADOR .....	35
	VALIDACIÓN DEL MODELO .....	36
6.2.9	VALIDACIÓN DEL TTI EN CONDICIONES ISOTÉRMICAS .....	37
6.2.10	VALIDACIÓN DEL TTI EN CONDICIONES DINÁMICAS DE TEMPERATURA .....	38
6.2.11	VALIDACIÓN DE LA RESPUESTA DEL TTI FRENTE AL CRECIMIENTO DE PATÓGENOS	38
7	CONCLUSIONES.....	41
8	RECOMENDACIONES:.....	42
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43
	ANEXOS .....	48
	Anexo 1: Crecimiento microbiano en la leche .....	48
	Anexo 2: Gráfica de residuales del ajuste del modelo de Gompertz a los datos de crecimiento microbiano en leche.....	54
	Anexo 3: Cambio de pH en la leche .....	55
	Anexo 4: Crecimiento del microorganismo indicador .....	58

Anexo 5: Gráfica de residuales del ajuste del modelo de Gompertz a los datos de crecimiento del microorganismo indicador .....	59
Anexo 6: Cambio de pH en el medio indicador.....	60
Anexo 7: Gráfica de residuales del ajuste del modelo para el cambio de pH a partir del crecimiento del microorganismo indicador .....	61
Anexo 8: Mediciones de color y cambio de color del indicador .....	62
Anexo 9: Gráfica de residuales del ajuste del modelo para el cambio de color a partir del pH en el indicador .....	67
Anexo 10: Tiempos de reacción en condiciones dinámicas de temperatura .....	68

## TABLA DE ECUACIONES

Ecuación 1: Ecuación del modelo logístico (Zwietering, Jongenburger, Rombouts, & van 'T Riet, 1990). .....	13
Ecuación 2: Modelo bifásico de crecimiento microbiano (Rosso I. , 1995). .....	13
Ecuación 3: Modelo explícito de crecimiento de Baranyi y Roberts (Poschet, Geeraerd, Scheerlinck, Nicolai, & Van Impe, 2003). .....	13
Ecuación 4: Ecuación para estimar el tiempo de reducción decimal de acuerdo con el modelo de Bigelow (Ray, 2005). .....	13
Ecuación 5: Modelo secundario para la tasa de crecimiento en función de temperatura (T), actividad de agua ( $a_w$ ) y pH (Koseki, 2009) .....	13
Ecuación 6: Modelo y para la tasa de crecimiento en función del pH y la temperatura (Rosso, Lobry, Bajard, & Flandrois, 1995).....	14
Ecuación 7: Ecuación de Gompertz modificada (Buchanan & Phillips, 1990).. .....	19
Ecuación 8: Ecuación para la estimación del factor bias (Ross, 1996).....	19
Ecuación 9: Ecuación para estimación del factor de exactitud (Ross, 1996).....	19
Ecuación 10: Forma diferencial de la ecuación de Gompertz modificada (Huang, 2003).....	20
Ecuación 11: Ajuste del modelo lineal a los datos de $\mu$ de la leche. Donde T corresponde a la temperatura en °C. ....	28
Ecuación 12: Ajuste del modelo cuadrático a los datos de duración de la fase lag de la leche. Donde T corresponde a la temperatura en °C.....	28
Ecuación 13: Ajuste del modelo de raíz cuadrada a los datos de $\mu$ de la cepa A con indicador. Donde T corresponde a la temperatura en °C. ....	32
Ecuación 14: Ajuste del modelo logarítmico a los datos de duración de la fase Lag para la cepa A con indicador. Donde T corresponde a la temperatura en °C. ....	32
Ecuación 15: Ecuación de hombro y reducción lineal (Geeraerd, Herremans , & Van Impe, 2000), parametrizada para pH y concentración en Log(UFC/mL).....	33
Ecuación 16: Correlación del cambio de color y el pH del indicador.....	34



## TABLA DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Diagrama de la cadena láctea en Colombia (Adaptado de: (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia, 2005)).....	8
Gráfica 2: Modelo de Arrhenius para las tasas de crecimiento de <i>Pseudomona fragi</i> , entre 2 y 22°C (Fu, Taoukis, & Labuza, 1991). ....	11
Gráfica 3: Medio de cultivo MRS y MRS con el indicador de pH. ....	22
Gráfica 4: Medio de cultivo MRS y MRS con el indicador de pH inoculados con <i>L. plantarum</i> , después de 24 horas de incubación a 37°C. ....	22
Gráfica 5: Recuentos comparativos para las tres cepas en MRS y MRS con el indicador de pH, después de 24h de incubación a 37°C. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3). ....	23
Gráfica 6: Crecimiento de las bacterias indicadoras a 37°C y 4°C, en MRS y en MRS con el indicador de pH, después de 24h de incubación a 37°C, 18 días de incubación a 4°C para MRS y 21 días de incubación para MRS con el indicador de pH Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3). ....	23
Gráfica 7: Fotografías de las colonias observadas en las leches A y B a 28°C.....	24
Gráfica 8: Tinción de Gram para la leche A, a 28°C. Azul-Morado Gram positivas, Rosado-Rojo Gram negativas. ....	25
Gráfica 9: Curvas de crecimiento de la microflora presente en la leche A y B en las condiciones experimentales. ....	26
Gráfica 10: Comparación de la tasa de crecimiento de la microflora entre la leche A y B.....	28
Gráfica 11: Curvas de reducción del pH en la leches A y B. ....	29
Gráfica 12: Curvas de crecimiento del indicador en las condiciones experimentales.....	31
Gráfica 13: Curvas de pH para el indicador en las condiciones experimentales. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3). ....	33
Gráfica 14: Correlación entre el pH y el $\Delta E$ . La línea sólida corresponde a la predicción del modelo, las líneas punteadas al intervalo de confianza del 95% y la línea horizontal un $\Delta E=8$ fijado como cambio de color de referencia. ....	34

Gráfica 15: Tasa de crecimiento en función de la temperatura (modelo de Arrhenius). Las líneas corresponden a las regresiones lineales de los dos parámetros. ....	36
Gráfica 16: Validación de la respuesta del TTI en condiciones isotérmicas .....	37
Gráfica 17: Validación del TTI para <i>E. coli</i> . A, corresponde a los tiempos de respuesta respecto a la temperatura, las líneas punteadas corresponden al intervalo de confianza del 95% propuesto por el PMP para el crecimiento de <i>E. coli</i> . B corresponde a la relación entre los dos tiempos de respuesta, donde la línea sólida corresponde a un ajuste perfecto.....	39
Gráfica 18: Validación del TTI para <i>L. monocytogenes</i> . A, corresponde a los tiempos de respuesta respecto a la temperatura, las líneas punteadas corresponden al intervalo de confianza del 95% propuesto por el PMP para el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> . B corresponde a la relación entre los dos tiempos de respuesta, donde la línea sólida corresponde a un ajuste perfecto.....	40

## TABLA DE TABLAS

Tabla 1: Principios y aplicación comercial de algunos TTI, adaptado de Maschietti, 2010. ....	5
Tabla 2: Características fisicoquímicas de la leche (Goff, 2011). ....	9
Tabla 3: Efecto de la temperatura de almacenamiento en los recuentos de microorganismos después de 24h, y sobre el mantenimiento de la calidad (Recuento inicial de $2.3 \times 10^3$ UFC/mL) (Walstra, 1999). ....	12
Tabla 4: Lista de bacterias utilizadas.....	16
Tabla 5: Resumen de los recuentos para la estandarización del inóculo. ....	21
Tabla 6: Rango y colores de viraje del azul de bromotimol. ....	21
Tabla 7: Parámetros y bondad de ajuste de la ecuación de Gompertz modificada a los datos de crecimiento microbiano de la leche A y B. Donde SE( ) corresponde al error estándar de las estimaciones. ....	27
Tabla 8: Evaluación del desempeño del modelo de deterioro para la leche A y B, y para el conjunto total de datos. ....	30
Tabla 9: Bondad de ajuste de la ecuación de Gompertz modificada a los datos de crecimiento de la cepa A en MRS con indicador. Donde SE ( ) corresponde al error estándar de las estimaciones. * Series de datos con error estándar en uno de los parámetros superior al 100%. ....	31
Tabla 10: Estimación de parámetros y bondad de ajuste para la relación entre pH y la concentración de microorganismo en Log(UFC/mL). ....	33

## RESUMEN

El deterioro de alimentos y la pérdida de los mismos son unas de las mayores preocupaciones de la industria de alimentos en países en vías de desarrollo. Las limitaciones técnicas y de infraestructura en redes de frío dificulta la utilización de las mismas como mecanismo para garantizar la inocuidad de los productos. La interrupción de la cadena de frío para alimentos perecederos puede ocasionar su deterioro y pérdida de inocuidad. El monitoreo de la temperatura de la cadena de frío permite anticipar el efecto de abusos de temperatura sobre determinado producto. Como estrategia se ha propuesto el uso de integradores de tiempo-temperatura (TTI), que son dispositivos pequeños que adheridos al empaque permiten una lectura en tiempo real de la calidad e inocuidad del producto. La leche por ser un producto altamente perecedero es un buen candidato para el uso de este tipo de dispositivos. El presente trabajo propone un prototipo; a nivel de componentes estructurales y modelos de respuesta para el desarrollo de un TTI de base microbiológica. Los modelos obtenidos permitieron relacionar de manera satisfactoria la respuesta del indicador frente al crecimiento de microorganismo presentes en leche pasteurizada comercial. Adicionalmente se desarrollaron los modelos que relacionan el crecimiento del microorganismo indicador con el cambio de pH y con el cambio de color ( $\Delta E$ ) del TTI. La validación de los modelos sobre los datos experimentales y sobre escenarios hipotéticos de abuso de temperatura mostró un desempeño adecuado del dispositivo así como una respuesta anticipada ante la eventual presencia de una concentración crítica de microorganismos en el producto.

## **ABSTRACT**

Food spoilage and food loss are a major concern of food industry in developing countries. Technical and structural constrains in the cold chain systems limit the use of refrigeration as tool to guarantee food safety. The breakdown of the cold chain for perishable foods can cause spoilage and/or render foodstuff unsafe. Cold chain monitoring might anticipate information of the effect of temperature abuse on food products. As a strategy the use of time temperature integrators (TTI) have been proposed. TTI are small devices attached to food packages that allow consumers get information about quality and safety of food stuff in real time. Milk as perishable product is a good candidate to incorporate the use of these devices. The purpose of this study was the design of a TTI prototype of microbiological base consistent in the structural components and response models. The models obtained correlate well the response of the TTI with the growth of microorganisms present in commercial pasteurized milk. Additionally, models that correlate the microbial growth of the indicator with the change on pH and  $\Delta E$  of the TTI were developed. The validation of the models with the available experimental and hypothetical abuse scenarios showed a good performance of the TTI. The TTI failed safe with an anticipated response to critical microbial concentrations.

# 1 INTRODUCCIÓN

Garantizar la inocuidad es siempre el reto para la industria de alimentos para obtener y mantener la confianza de los consumidores. Actualmente los desafíos para cumplir con esta característica no negociable se hacen más grandes en la medida que los consumidores mejor informados desean alimentos naturales y nutritivos, fáciles de preparar y de larga vida útil.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) siguen siendo uno de los problemas de salud pública más relevantes a nivel mundial, pese a los avances que se han dado en la “masificación” de la refrigeración, método reconocido por ser eficiente en el control de los fenómenos de deterioro y crecimiento microbiano (WHO Media centre, 2007). Contar con herramientas económicas, industrializables y seguras que permitan un control en tiempo real de las condiciones de almacenamiento de los productos, permitiría reducir de manera efectiva las ETA, asociadas a alimentos refrigerados.

Por otro lado la pérdida de alimentos por deterioro y desperdicio a nivel mundial alcanza cifras preocupantes. Gustavsson y otros (2011) afirman que esta cifra asciende a cerca de un tercio de la producción de alimentos, que equivale a 1300 millones de toneladas. Estas pérdidas están asociadas a diversos factores y abarcan toda la cadena productiva. Sin embargo, hay dos factores que se destacan: (1) las limitaciones técnicas, principalmente en los países en vías de desarrollo y (2) el manejo de las fechas de vencimiento, principalmente en comunidades con alto poder adquisitivo.

Los productos lácteos y la leche en particular no son ajenos a esta problemática. Kantor y otros (1997) establecieron que cerca del 32% de la leche se pierde en los Estados Unidos, considerando las pérdidas en los distribuidores, supermercados y consumidores finales. Las principales causas de estas pérdidas se asocian a que el producto supera la fecha de vencimiento en el empaque y a deterioro del producto a nivel de consumidores y establecimientos comerciales; comúnmente por acción de microorganismos. Este último aspecto se asocia estrechamente con el manejo de las cadenas de frío particularmente con el rompimiento de la misma, lo cual permite la proliferación de microorganismos patógenos y deteriorativos. Extrapolando los hallazgos de Kantor y otros (1997) y considerando las limitaciones técnicas en la existencia y manejo de las cadenas de frío la problemática y las pérdidas de este producto en los países en vías de desarrollo como Colombia, deben ser superiores al 32%.

El mantenimiento de la cadena de frío es una de las alternativas para reducir las pérdidas de leche y de productos lácteos. El uso de dispositivos electrónicos de seguimiento de temperatura es costoso y no viable a nivel de empaques individuales, lo que impide que el control llegue hasta el consumidor final como último eslabón de la cadena. Como alternativa a los dispositivos electrónicos se han desarrollado sistemas integradores de tiempo-temperatura (TTI – Time Temperature Integrator – en inglés), que reaccionan al rompimiento de la cadena de frío y

permiten hacer una evaluación en tiempo real del manejo de la temperatura a lo largo de toda la cadena de distribución. Dadas sus características es posible utilizar este tipo de dispositivos en empaques individuales, sin que se afecte de manera significativa el costo del producto final, y realizar el proceso de monitoreo y control en cualquier punto de la cadena.

El uso de TTI en el control de la cadena de frío ha sido aplicado con éxito en varios productos, inicialmente en la industria farmacéutica y recientemente en la industria de alimentos (Maschietti, 2010). Adicionalmente con la implementación de TTI se han desarrollado estrategias en el manejo de inventarios de productos precederos pasando del tradicional enfoque “primero en entrar primero en salir” (FIFO – First In First Out – en inglés), a un enfoque “próximo al deterioro primero en salir” (FSFO – First Spoiled First Out – en inglés), enfoques que soportan sistemas de decisión de vida de anaquel (SLDS – Shelf Life Desition System – en inglés) (Koutsoumanis, Giannakourou, Taoukis, & Nychas, 2002) y sistemas de monitoreo y aseguramiento de inocuidad (SMAS – Safety Monitoring and Assurance System – en inglés) (Koutsoumanis, Taoukis, & Nychas, 2005).

En respuesta a la problemática y considerando la alternativa de los TTI, este trabajo abarca el desarrollo de un prototipo a nivel de componentes y modelos de respuesta, para un TTI de base microbiológica, para su eventual utilización en leche pasteurizada refrigerada. El desarrollo de este tipo de dispositivos inicia con la selección de los componentes estructurales del TTI, la evaluación y cuantificación de las respuestas de deterioro del producto y del TTI, el desarrollo de modelos de correlación entre las dos respuestas y la validación de los resultados.

# **1 OBJETIVOS**

## **1.1 OBJETIVO GENERAL**

Establecer la relación entre el cambio en un indicador de base microbiológica y el deterioro de la leche en condiciones de refrigeración y abuso de temperatura para el diseño de un TTI.

## **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Seleccionar los componentes del TTI; sustrato, indicador y agente microbiológico.
- Relacionar la cinética de deterioro y la cinética de cambio del indicador.
- Validar el comportamiento del prototipo en condiciones de refrigeración y abuso de temperatura.



## 2 ESTADO DEL ARTE

Los integradores de tiempo temperatura (TTI), son dispositivos que responden a cambios de temperatura en el tiempo y esto los diferencia de los indicadores, que responden a cambios puntuales de temperatura independientemente del tiempo en que el cambio ocurra. Los TTI, no son una tecnología nueva, se desarrollaron para la industria farmacéutica y la Organización Mundial de la Salud en la década de 1960 (Fu, Taoukis, & Labuza, 1992), para garantizar la viabilidad de las vacunas en zonas donde las cadenas de frío son deficientes y han evolucionado en el tiempo hasta incorporar sistemas electrónicos y de radiofrecuencia (RFID), pasando por sistemas basados en principios físicos, químicos, y biológicos. Su aplicación en alimentos tampoco es nueva, Olley (1978) reporta la existencia de TTI tanto físicos como químicos e invita a la utilización de sistemas electrónicos (Data logger) para el monitoreo de temperatura en el almacenamiento de alimentos.

Taoukis y Labuza (1989) definen los TTI como dispositivos pequeños, de bajo costo, adheribles a los alimentos o a los empaques de alimentos, que muestran un cambio dependiente de la interacción tiempo-temperatura. Adicionalmente plantean que el cambio observado debe ser irreversible y que idealmente el fenómeno debe representar o correlacionarse fácilmente con el grado de deterioro o la vida útil residual del producto. Esta definición fue corroborada por Maschiatti (2010), quien adicionalmente excluye a los RFID, de los TTI por el alto costo de los mismos; que actualmente no los hace económicamente viables para ser colocados en empaques individuales. Adicionalmente la no toxicidad o patogenicidad en los componentes del TTI es un requisito para su utilización en alimentos (Sherlock & Labuza, 1992).

Los TTI que se han desarrollado hasta ahora considerando las características anteriormente expuestas se pueden clasificar a partir de sus componentes y principios activos. Los TTI físicos responden a los cambios de temperatura con cambios en la estructura del dispositivo, rompimiento de barreras sensibles a la temperatura, entre otros. Sus principios activos están asociados a temperaturas de fusión, y velocidades de migración o difusión de compuestos sobre una matriz (Wanihsuksombat, Hongtrakul, & Suppakul, 2010). Los TTI químicos responden con una reacción química catalizada por temperatura, entre los principios activos asociados a este tipo de TTI están las reacciones de polimerización, reacciones de síntesis o degradación de compuestos cromóforos (Galagan & Su, 2008) y reacciones de isomerización (Kreyenschmidt, Christiansen, Hübner, Raab, & Petersen, 2010) entre otros. Los TTI biológicos responden a un fenómeno biológico, como una reacción enzimática (Bobelyn, Hertog, & Nicolai, 2006; Ravuyan, Tang, Orellana, & Rasco, 2003), el crecimiento de microorganismos o la producción de metabolitos por microorganismos (Ellouze, y otros, 2008). En este tipo de TTI pueden intervenir varios principios activos; cambios de color por acidificación del medio, turbidez por el crecimiento del microorganismo, cambios en la turbidez por acción de complejos enzimáticos, etc., aunque por lo general prevalece uno sobre los demás. Por otra parte existe una clasificación relacionada con la información suministrada por el TTI, que puede ser de punto final (End Point), indicando que la

vida útil del producto ya ha terminado, o de historia completa (Full History), indicando a través de sistemas y software de soporte, que tanto de la vida útil se ha consumido o cuanto queda restante, paralelamente se pueden hacer lecturas del estado actual del producto en cuanto a su calidad (Maschietti, 2010).

**Tabla 1: Principios y aplicación comercial de algunos TTI, adaptado de Maschietti, 2010.**

FUNDAMENTO DE LA INVENCION			TTI COMERCIAL RELACIONADO			
Principio de funcionamiento	Tipo <sup>1</sup>	Lectura <sup>2</sup>	TTI comercial	Objetivo <sup>3</sup>	Tiempo de operación	Almacenamiento <sup>4</sup>
Reacciones acetilénicas	F	QLT	Fresh-Check, HEATmarker	A,R	Algunos días- Algunos años	R
Reacciones fotocrómicas	F	QLT	OnVu	R	<2 semanas	N
Reacciones (Foto) termografías	F	QLT				
Colorantes agregocrómicos	P	QLT				
Enzimas + indicadores de pH	F	END	Check-Point I	R	1 día- 2 meses	R
Bacterias + indicadores de pH	F	END	(eO) TRACEO	R		R
Difusión + indicadores de pH	F	QLT	TT Sensor	R	5 – 15 días	<24°C
Difusión + reacción química	F	QLT				
Acción capilar + viscoelasticidad de materiales	F	QLT				
Acción capilar + viscoelasticidad de materiales	P	QLT				
Fusión de sólidos + acción capilar	P	QNT	MinitorMark	-17°C-31°C	1 día – 2 semanas	<22°C
Acción capilar + líquidos de alta viscosidad	F	QNT				
Actividad osmótica + líquidos de alta viscosidad	F	QNT				
Acción neumática + líquidos de alta viscosidad	F	QNT				
Difusión en matrices solidas	P	QLT/END				
Fusión y difusión	P	QNT		F		
Nanopartículas	F	QLT				

Leyenda:

1 F=TTI de historia completa; P=TTI de historia parcial.

2 QLT=Cualitativo; QNT=Cuantitativo; END=Punto final.

3 A=Productos temperatura ambiente; R=Productos refrigerados; F=Productos congelados.

4 N=temperatura ambiente; R=Refrigerado.

La Tabla 1 muestra algunos de los TTI que actualmente tienen aplicaciones comerciales o que potencialmente pueden llegar a nivel comercial. Se observa la tendencia al desarrollo de sistemas cualitativos orientados productos perecederos que requieren ser almacenados en condiciones de refrigeración o congelación. Por otro lado solo 5 de los 17 inventos reportados han llegado a la aplicación comercial, un claro indicativo de la dificultad de llevar el desarrollo de un TTI a la aplicación comercial.

La aplicación de TTI como herramientas para el manejo y aseguramiento de la calidad y la inocuidad de alimentos ha alcanzado un amplio rango de aplicación; desde leche y productos lácteos, hasta carnes, pescados y ensaladas. Shellhammer y Singh (1991), evaluaron el desempeño del I-POINT® para predecir el deterioro de queso cottage, la correlación entre la predicción del TTI y el deterioro observado fue bueno, alcanzando a identificar dos patrones de deterioro uno asociado a organismos psicotróficos por debajo de 8.8°C y otro asociado a bacterias ácido lácticas por encima de 8.8°C. Fu, Taoukis, y Labuza (1991), utilizaron un TTI y herramientas de microbiología predictiva para monitorear el deterioro de leche por *Pseudomonas fragi* logrando describir adecuadamente la velocidad de crecimiento y la fase lag a temperatura constante, pero fallando al momento de incorporar cambios de temperatura, presentando predicciones seguras por defecto. Lasso (2010), desarrollo un prototipo con capacidad de responder a condiciones de abuso de temperatura, que al igual que en el caso anterior el prototipo tiende a dar respuestas seguras por defecto considerando la población propia de la leche (mesófilos aerobios a partir de recuento en placa en PCA).

La aplicación de TTI validados en sistemas alimenticios, no solo permite tener un control en el consumidor final sino que también permite modificar las políticas de manejo de inventarios para reducir las pérdidas por deterioro. Desarrollos como el sistema de decisión de vida de anaquel (Shelf Life Decision System, SLDS) (Koutsoumanis, Giannakourou, Taoukis, & Nychas, 2002) y el sistema de monitoreo y aseguramiento de la inocuidad (Safety Monitoring and Assurance System, SMAS), permiten mejorar el desempeño de los inventarios reduciendo la cantidad de producto que llega a un eslabón determinado de la cadena de abastecimientos con una carga microbiana o nivel de deterioro que pueda implicar riesgo de enfermedad o daño organoléptico.

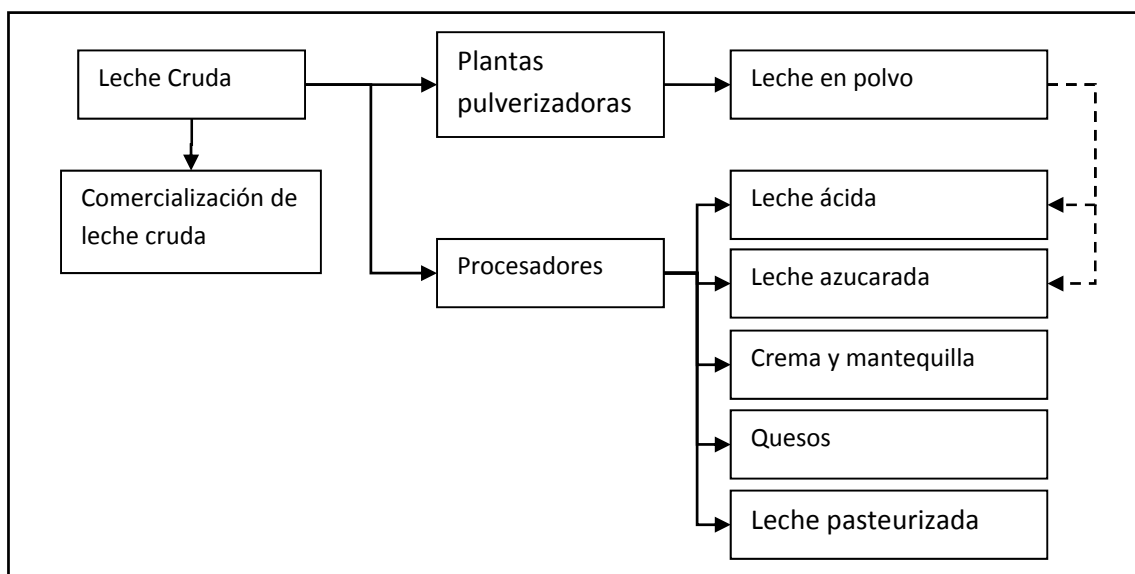
Sherlock y Labuza (1992) describieron la percepción de los consumidores por las etiquetas que daban información sobre el grado de frescura de la leche. Los resultados mostraron que los consumidores no confían en la frescura de leche a partir de las fechas de vencimiento impresas en los empaques, pero que el uso de TTI podría incrementar esa confianza, lo que evidencia la voluntad de los consumidores por comprar productos etiquetados con TTI en lugar de los no etiquetados. Fortin y Goodwin (2008), realizaron un estudio similar en Bélgica para el TTI Fresh-Check®, y concluyen que la población objetivo en ese país serían mujeres entre 40 y 60 años de edad, quienes pueden tener niños a cargo y que están preocupadas por lo que comen ellas y sus familias, adicionalmente se encontró un gran número de respuestas “tal vez”, lo que ratifica los

hallazgos de Sherlock y Labuza en cuanto a la necesidad de mejorar la educación de los consumidores sobre este tipo de dispositivos.

### 3 MARCO TEÓRICO

#### 3.1 LA LECHE

La producción de leche en Colombia estaba en el orden de 6000 millones de litros en el año 2004 (Departamento Nacional de Planeación, 2007) y se ha incrementado hasta 6500 millones de litros en el año 2008 de acuerdo con Fedegan (FEDEGAN, 2010). El DANE reporta que cerca del 26% de la leche producida a nivel nacional es procesada; de acuerdo con los productores ese porcentaje es del 32% (DANE, 2004), pero no es claro que ocurre con el 70% restante. Si se considera que en el 2006 entró en vigencia el decreto 616, que regula la comercialización de leche para el consumo humano y/o destinada a la producción de derivados lácteos, y hace “obligatoria” la refrigeración y procesamiento térmico de la leche, se espera que los porcentajes de procesamiento hayan aumentado en los últimos 4 años. Según el DNP en el 2007 el 88% de la producción lechera nacional es absorbida por la industria (Departamento Nacional de Planeación, 2007), lo cual invierte los porcentajes reportados por FEDEGAN y el DANE en el 2004.



Gráfica 1: Diagrama de la cadena láctea en Colombia (Adaptado de: (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agro cadenas Colombia, 2005)).

La cadena láctea en Colombia inicia con los productores primarios de leche, caracterizados por su diversidad en tamaño: desde grandes productores; concentrados en la sabana de Bogotá, Antioquia y la costa Atlántica, hasta pequeños productores diseminados a lo largo y ancho del país, algunos de los cuales tienen producciones que rallan en la escala económica de subsistencia. Seguidamente están los acopiadores y transportadores responsables de la acumulación y proveeduría a las grandes procesadoras y transformadoras del producto. La industrialización del sector está dividida en tres grupos donde las plantas pulverizadoras y los procesadores; tanto

tecnificados como artesanales son los responsables de aportar valor agregado al producto (Gráfica 1). De acuerdo con el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), la leche consumida por la industria se destina a la pasteurización 38%, leche en polvo 29%, leche UHT 19% quesos 8% y otros productos lácteos el 6% (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), 2010).

Las características de la cadena láctea hacen que el control y el mantenimiento de las condiciones adecuadas de almacenamiento y transporte refrigerados sean difíciles de mantener y garantizar. Adicionalmente la infraestructura eléctrica en algunas de las zonas productoras del país es pobre o inexistente y los altos costos asociados a los sistemas de refrigeración limitan el cumplimiento de la reglamentación que obliga a la refrigeración (4°C) de la leche cruda (Ministerio de la Protección Social, 2006).

### 3.1.1 CARACTERÍSTICAS Y PROCESOS DETERIORATIVOS DE LA LECHE

Por sus características fisicoquímicas (Tabla 2), la leche es un producto altamente perecedero susceptible al deterioro microbiano y químico. Entre los fenómenos químicos se destacan la hidrólisis de lípidos o rancidez hidrolítica, la oxidación, y la foto-oxidación. La hidrólisis de lípidos ocurre por la acción enzimática de una lipasa sobre los complejos lipídicos generando ácidos grasos de cadena corta; principalmente ácido butírico, responsables del olor del producto deteriorado, la lipasa es generalmente de origen microbiano, sensible a temperaturas entre los 55°C y 60°C, y especialmente activa sobre glóbulos de grasa afectados en el proceso de homogenización. La oxidación afecta inicialmente a los fosfolípidos del glóbulo de grasa y se propaga en los triglicéridos; principalmente en los triglicéridos insaturados, formando finalmente aldehídos y cetonas que tienen olor y sabor marcados, diferentes factores afectan la secuencia de reacciones pero la presencia de metales; como cobre, y la ausencia de antioxidantes naturales (Vitamina E) pueden inducir la autooxidación. La fotooxidación, es un proceso oxidativo inducido por la luz solar y particularmente por los rayos UV, la luz activa la riboflavina que cataliza la reacción de metionina a metanal, generando sabores y olores similares a los de la oxidación pero que tienden a disminuir durante el almacenamiento (Goff, 2011).

**Tabla 2: Características fisicoquímicas de la leche (Goff, 2011).**

Propiedad	Valor
pH	6.5-6.7
a <sub>w</sub>	>0.99
%Agua	85.5-88.7
%Azúcares	4.6
%Proteína	3.25
%Grasa	2.4-5.5

El deterioro microbiano que se puede observar en la leche es variado. Esa variabilidad está asociada al tipo de microorganismos presentes los cuales están asociados a la salud de los animales, las prácticas de manipulación y los procesos a los que se ha sometido el producto. Entre los grupos

de microorganismos relevantes en el deterioro de la leche están las bacterias ácido lácticas, los coliformes, los psicrótrofos, y los resistentes al calor.

Las bacterias ácido lácticas producen ácido láctico por la fermentación de la lactosa, son un grupo bastante grande que incluye géneros como *Lactococcus* y *Lactobacillus*. Crecen con facilidad cuando la leche no es refrigerada generando acidez e inutilizando la leche para el procesamiento al producir inestabilidad térmica; al ser calentada la leche se separa en sus fases acuosa y proteica. La mayoría de la bacterias ácido lácticas son controladas por procesos de pasteurización e incluso termización, sin embargo estos tratamientos no controlan a las bacterias ácido lácticas termofílicas como *Streptococcus thermophilus* (Walstra, 1999), lo que permite que algunos de estos microorganismos produzcan deterioro en etapas posteriores a la pasteurización.

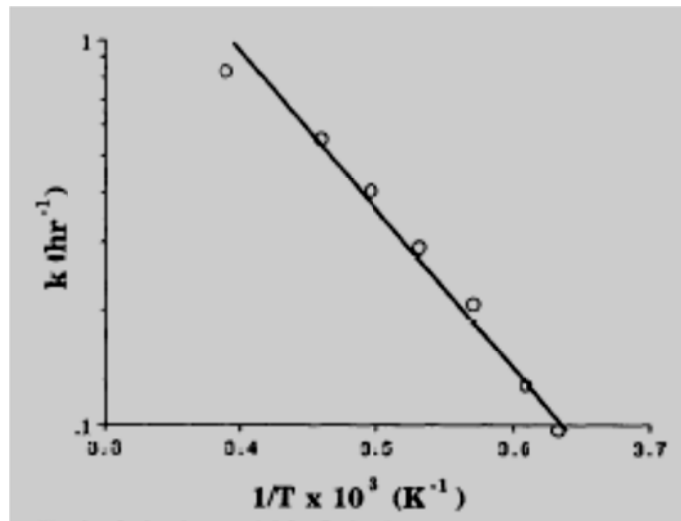
Los coliformes son otro grupo bastante grande miembro de las enterobacterias que incluye microorganismos tanto patógenos como deteriorativos. Crecen en leche con facilidad, especialmente a temperaturas por encima de los 20°C, metabolizando proteínas y lactosa, con producción de gas y deterioro en el sabor de la leche (Walstra, 1999). Los coliformes al igual de las bacterias ácido lácticas y otros grupos de microorganismos de interés se pueden controlar por procesos de pasteurización, por lo que su presencia en etapas posteriores se considera un indicativo de recontaminación o de falla en el proceso de pasteurización.

Los psicótrofos son microorganismos deteriorativos que crecen con facilidad a temperaturas por debajo de los 15°C, en leche pueden crecer incluso por debajo de los 4°C; aunque crecen de manera óptima entre 20°C y 30°C. Ocurren con relativa frecuencia e incluyen *Listeria monocytogenes*, los géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* y *Alcaligenes*, entre otros. Los metabolitos producidos por la mayoría de las bacterias en este grupo se destacan las enzimas lipolíticas y proteolíticas, responsables de procesos de deterioro que incluyen los sabores y olores pútridos y rancios. La mayoría de los psicótrofos se pueden controlar por procesos de pasteurización, sin embargo muchas de las enzimas son termoresistentes lo que ocasiona que en condiciones adecuadas; principalmente de temperatura, se presenten procesos lipolíticos y proteolíticos que generan cambios en el olor el sabor y eventualmente en las características fisicoquímicas de la leche después de la pasteurización (Walstra, 1999).

*Micobacterium lacticum*, algunos *Streptococcus* y algunos *Micrococcus*, entre otros, hacen parte de las bacterias termoresistentes; bacterias que no forman esporas, pero que en sus formas vegetativas pueden soportar los procesos de pasteurización. Aunque normalmente se encuentran en bajas concentraciones, en ausencia de otros microorganismos prosperan con facilidad si las condiciones de temperatura son favorables (>20°C). Otro grupo dentro de las bacterias termoresistentes son los formadores de esporas, principalmente miembros de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*. En la industria láctea son especialmente relevantes: *B. cereus* que crece a temperaturas tan bajas como 7°C y es responsable de procesos deteriorativos como el cortado dulce (Sweet curdling – en inglés), el desarrollo de sabores desagradables y el colapso de los

glóbulos de grasa, *B. subtilis* y *B. stearothermophilus* que pueden deteriorar leche que no ha sido adecuadamente pasteurizada, y *C. tyrobutiricum*, que es responsable del embobado tardío (late blowing – en inglés) de quesos, con la formación de ácido butírico que produce un olor y sabor desagradables, e hidrogeno que produce grandes burbujas en los quesos (Walstra, 1999).

Estudios sobre las cinéticas de deterioro tanto microbiológicas como químicas han mostrado una estrecha relación entre la temperatura a la cual se expone el producto y la velocidad a la que ocurren los fenómenos deteriorativos (Hamm, Hammond, & Hotchkiss, 1968; Taoukis & Labuza, 1989; Fu & Labuza, 1992). A partir de estas investigaciones se ha establecido que estos fenómenos ocurren como reacciones de primer orden y que se pueden describir en función de la temperatura utilizando el modelo de Arrhenius como se observa en la Gráfica 2.



Gráfica 2: Modelo de Arrhenius para las tasas de crecimiento de *Pseudomona fragi*, entre 2 y 22°C (Fu, Taoukis, & Labuza, 1991).

### 3.1.2 PASTEURIZACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LA LECHE

La pasteurización es un proceso por medio del cual se reduce la carga de microorganismos en un producto por acción del calor. La pasteurización de leche se ha utilizado durante mucho tiempo de manera relativamente segura. Los métodos de pasteurización utilizados en el procesamiento de leche son 62.8°C durante 30 min (LTLT, por sus siglas en inglés) o 71.7°C durante 15s (HTST, por sus siglas en inglés). Estos tratamiento son suficiente para destruir a la mayoría de mesófilos, enterobacterias y a *Coxiela burnetii*, el patógeno termoresistente responsable de la fiebre Q. Inmediatamente después de los tiempos de retención (30min para LTLT y 15s para HTST) la leche es enfriada a 4°C, temperatura a la que se debe mantener hasta el consumo (Ray, 2005).

La carga microbiana inicial con que llega la leche cruda a las plantas de procesamiento influye sobre la calidad de la leche pasteurizada refrigerada a nivel comercial (Fromm & Boor, 2004). La



carga inicial de bacterias y las características de la misma; presencia de termoresistentes y formadores de esporas, han limitado el incremento de la vida útil de la leche procesada por estos métodos al no poder impedir que algunos microorganismos lleguen al producto final. En los casos en que la carga inicial de microorganismos es alta, y no se ajustan los procesos térmicos (incrementando la temperatura o el tiempo de retención) el proceso de pasteurización no es seguro. Adicionalmente la eliminación de los microorganismos no es suficiente para impedir el deterioro de la leche, la presencia de enzimas termoresistentes; que actúan sobre lípidos y proteínas, y que son producidas por los microorganismos o son liberadas durante el proceso de pasteurización son responsables de procesos deteriorativos que hacen que la leche no sea agradable para consumir (Barbano, Ma, & Santos, 2006).

**Tabla 3: Efecto de la temperatura de almacenamiento en los recuentos de microorganismos después de 24h, y sobre el mantenimiento de la calidad (Recuento inicial de  $2.3 \times 10^3$  UFC/mL) (Walstra, 1999).**

Temperatura de Almacenamiento	Recuentos después de 24h (UFC/mL)	Tiempo de duración de la calidad microbiológica (< $1 \times 10^5$ UFC/mL) (h)
4	$2.5 \times 10^3$	>75
10	$1.2 \times 10^4$	30
16	$1.8 \times 10^5$	19
20	$4.5 \times 10^6$	11
30	$1.4 \times 10^9$	5

Diversos estudios (Taoukis & Giannakourou, 2004; Garrido, García-Jalón, & Vitas, 2010) mostraron que tanto los sistemas de refrigeración comerciales como domésticos operan en condiciones por fuera de los rangos recomendados de temperatura ( $4^\circ\text{C} - 6^\circ\text{C}$ ), lo que favorece el crecimiento de microorganismo contaminantes y el desarrollo de reacciones deteriorativas (Tabla 3). Como consecuencia de lo anterior, la leche refrigerada es asociada de manera recurrente con brotes de ETA, que se relacionan principalmente con la presencia de *Listeria*, *Salmonella*, o *E. coli* (Oliver, Boor, Murphy, & Murinda, 2009).

### 3.2 MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA

La microbiología predictiva es una herramienta en la cual se incorporan el conocimiento microbiológico de las cinéticas de crecimiento e inactivación de los microorganismos entre otros, con conocimientos en matemática y simulación. Tiene como objetivo el desarrollo de modelos matemáticos que describan los comportamientos microbianos; crecimiento, inactivación e interacción de microorganismos, y la producción de metabolitos entre otros (Zwietering & den Besten, 2010).

Los modelos utilizados en microbiología predictiva se clasifican en primarios, secundarios y terciarios. Los modelos primarios establecen relaciones entre el crecimiento o inactivación microbiana y el tiempo; permiten establecer parámetros cinéticos como: la duración de la fase lag, la velocidad de crecimiento, el estado fisiológico de las células, la velocidad de inactivación, entre

otros. Entre los modelos primarios más conocidos están el modelo de Gompertz, el modelo logístico (Ecuación 1), el modelo bifásico (Ecuación 2) y el modelo de Baranyi o modelo D (Ecuación 3), los cuales pueden describir tanto fenómenos de crecimiento como de inactivación cambiando el signo del parámetro de velocidad, y el modelo de Bigelow para estimar el efecto de tratamientos térmicos.

$$y = \frac{a}{[1 + \exp(b - c \cdot x)]}$$

**Ecuación 1: Ecuación del modelo logístico (Zwietering, Jongenburger, Rombouts, & van 'T Riet, 1990).**

$$\ln(N) = \begin{cases} \ln(N_0) & t \leq \lambda \\ \ln(N_{max}) - \ln\left\{1 + \left[\frac{N_{max}}{N_0} - 1\right] \cdot \exp[-\mu_{max} \cdot (t - \lambda)]\right\} & t > \lambda \end{cases}$$

**Ecuación 2: Modelo bifásico de crecimiento microbiano (Rosso I., 1995).**

$$n(t) = n_0 + \mu_{max} \cdot A(t) - \ln\left(1 + \frac{e^{\mu_{max} \cdot A(t)} - 1}{e^{(n_{max} - n_0)}}\right)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \cdot \ln\left(\frac{e^{-\mu_{max} \cdot t} + \frac{1}{e^{\lambda \cdot \mu_{max}} - 1}}{1 + \frac{1}{e^{\lambda \cdot \mu_{max}} - 1}}\right)$$

**Ecuación 3: Modelo explícito de crecimiento de Baranyi y Roberts (Poschet, Geeraerd, Scheerlinck, Nicolaï, & Van Impe, 2003).**

$$D_T = \frac{t}{\text{Log}_{10} Y_{inicial} - \text{Log}_{10} Y_{final}}$$

**Ecuación 4: Ecuación para estimar el tiempo de reducción decimal de acuerdo con el modelo de Bigelow (Ray, 2005).**

Los modelos secundarios relacionan los parámetros de los modelos primarios con variables independientes relacionadas tanto intrínsecas como extrínsecas, como son: el pH, la actividad de agua ( $a_w$ ), la temperatura, el contenido de sustancias inhibitorias como NaCl, ácidos orgánicos, bacteriocinas, otros microorganismos, la intensidad de tratamientos no térmicos, entre otras. En este tipo de modelos se destacan los modelos de raíz cuadrada o cuadráticos (Ecuación 5), que describen el comportamiento de los parámetros con máximos o mínimos dentro del espacio experimental, las superficies de respuesta, los modelos cardinales (Pinon, y otros, 2004) y los modelos de tipo Gamma ( $\gamma$ ) (Ecuación 6) o de efectos multiplicativos.

$$\sqrt{\mu_{max}} = c \cdot (T - T_{min}) \cdot \sqrt{(a_w - a_{wmin})} \cdot \sqrt{1 - 10^{pH_{min} - pH}}$$

**Ecuación 5: Modelo secundario para la tasa de crecimiento en función de temperatura (T), actividad de agua ( $a_w$ ) y pH (Koseki, 2009)**

$$\mu_{max} = \mu_{opt} \cdot \gamma(pH) \cdot \gamma(T)$$

$$\gamma(pH) = \left\{ \frac{(pH - pH_{min}) \cdot [1 - e^{c_2 \cdot (pH - pH_{max})}]}{(pH_{opt} - pH_{min}) \cdot [1 - e^{c_2 \cdot (pH_{opt} - pH_{max})}]} \right\}^2$$

$$\gamma(T) = \left\{ \frac{(T - T_{min}) \cdot [1 - e^{c_2 \cdot (T - T_{max})}]}{(T_{opt} - T_{min}) \cdot [1 - e^{c_2 \cdot (T_{opt} - T_{max})}]} \right\}^2$$

**Ecuación 6: Modelo  $\mu$  para la tasa de crecimiento en función del pH y la temperatura (Rosso, Lobry, Bajard, & Flandrois, 1995).**

Finalmente los modelos terciarios incorporan tanto los modelos primarios como secundarios en aplicaciones específicas, generalmente en sistemas de software. Los modelos terciarios pueden desarrollarse y aplicarse tanto en condiciones estáticas; cuando las variables asociadas al modelo permanecen constantes durante la ventana de tiempo de interés, o en condiciones dinámicas cuando estas cambian con el tiempo (McMeekin, y otros, 1997; Baranyi & Roberts, 2004; Peleg, 2006).

Dada su complejidad estos modelos se han trabajado de manera relativamente reciente (Baranyi & Roberts, 1994; Zwietering & den Besten, 2010). Actualmente se encuentran disponibles aplicaciones de microbiología predictiva que abarcan modelos primarios secundarios y terciarios, y una base de datos que recopila información sobre curvas de crecimiento e inactivación en diferentes condiciones ([www.combase.cc](http://www.combase.cc)). Entre las aplicaciones de modelos primarios se destacan el DmFit, capaz de ajustar datos de crecimiento a los modelos más comunes de crecimiento (Gompertz modificado, Modelo D o de Baranyi y al modelo bifásico), y el GinaFit, que ajusta datos de inactivación a diferentes modelos de inactivación. Aplicaciones puntuales para los modelos secundarios no se han desarrollado hasta ahora, por lo general se utilizan herramientas estadísticas de regresión múltiple como las superficies de respuesta u otras herramientas para el ajuste de datos que permiten estimar el comportamiento de los parámetros de interés. A nivel de modelos terciarios existen varias aplicaciones las más comunes asociadas a software libre disponible en internet son el Pathogen Modeling Program (<http://pmp.arserrc.gov/>), del departamento de agricultura de los Estados Unidos, el Growth Predictor y el Perfringens Predictor ([www.ifr.ac.uk/safety/growthpredictor/](http://www.ifr.ac.uk/safety/growthpredictor/)) de IFR en Inglaterra, y el SymPrevious (<http://www.symprevious.net/index.php>) desarrollado en Francia por el gobierno y la industria como herramienta para la toma de decisiones en inocuidad de alimentos; cabe mencionar que este es el software de microbiología predictiva con mayor aplicación comercial. Adicionalmente Koseki (2009), desarrollo una aplicación basada en datos de ComBase, para estimar la frontera de crecimiento microbiano en diferentes alimentos a partir de las características de los mismos ( $a_w$  y pH principalmente).

Como criterios de bondad de ajuste se utilizan el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), el error cuadrado medio (MSE), el análisis de residuos y el error estándar o estimado de los parámetros (SE). En la literatura se encuentran reportados modelos con ajustes satisfactorios con  $R^2 \geq 0.7$  (Skandamis & Nychas, 2000), y con errores estándar del orden del 30% (Baranyi & Roberts, 1995).

La aplicación de modelos requiere no solo de un ajuste satisfactorio, sino de predicciones adecuadas. Dado que los modelos se desarrollan en medios de laboratorio y en condiciones favorables para los microorganismos es necesario validar las predicciones de los modelos. Como criterios de validación se han desarrollado varios índices que cuantifican la discrepancia entre las predicciones y los datos obtenidos experimentalmente. Ross (1996), propuso el factor bias que estima la razón promedio entre los datos observados experimentalmente y los predichos por el modelo y el factor de exactitud que da un estimado de la razón absoluta promedio entre los datos observados experimentalmente y los predichos por el modelo. El factor bias podrá tomar valores mayores a 0, un valor de 1, que indica un ajuste “perfecto” del modelo, valores menores a 1 indican que el modelo tiende a ser seguro por defecto, y valores mayores a 1 indican que el modelo tiende a ser inseguro por defecto. Las diferencias hacia arriba o hacia debajo de 1 se pueden interpretar como el promedio porcentual de las diferencias entre los datos observados y predichos, es decir que “un valor de 1.1 no solo indica que el modelo es inseguro por defecto sino que además en promedio las predicciones son un 10% mayores que los datos observados”. El factor de exactitud tomará valores iguales o mayores a 1; cuanto más grande es el factor de exactitud menos exacto es el modelo, así por ejemplo: un factor de exactitud de 1.3 indicara que en promedio los datos predichos son un 30% mayores o un 30% menores que los observados experimentalmente.

El uso de aplicaciones de microbiología a nivel industrial y de investigación es amplio, el Food Safety and Inspection Service (FSIS) y la Food and Drugs Administration (FDA), las aceptan como herramientas en el aseguramiento de la inocuidad de alimentos y como soporte de sistemas HACCP (Zwietering, de Wit, & Notermans, 1996) han sido utilizadas en procesos de evaluación cuantitativa de riesgo microbiológico (van Gerwen & Zwietering, 1998), y la validación de procesos industriales entre otras.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 BACTERIAS INDICADORAS Y PREPARACIÓN DEL INÓCULO

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron bacterias de la colección de la Facultad de Ingeniería, de la Universidad de la Sabana. Los microorganismos utilizados, aislados de productos lácteos, se muestran en la Tabla 4, identificados a nivel de especie por pruebas bioquímicas y secuenciación de ADN.

**Tabla 4: Lista de bacterias utilizadas**

Bacterias
<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Pediococcus acidilactis</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>

Las bacterias se activaron de manera individual a partir de dos perlas de cryovial (CRYOBANK®) en 10mL de caldo nutritivo (Scharlau, Art. No. 02-140), se incubaron a 37°C durante 16-24h. Posteriormente se realizó un subcultivo transfiriendo de 100µL del cultivo activo a otro tubo con 10mL de caldo nutritivo, el subcultivo se incubó a 37°C durante 24h más.

### 4.2 LA LECHE

Se utilizaron dos leches pasteurizadas comerciales. La compra se realizó en supermercados locales (Bogotá) y se mantuvo la cadena de frío (4°C ±2°C) hasta la llegada del producto al laboratorio. Como criterio de selección se consideró que las leches tuvieran la fecha de vencimiento en al menos un día después de iniciar las pruebas de laboratorio; las leches con mayor vida útil al momento de iniciar las pruebas de laboratorio tenían tres días de vida útil restante, de acuerdo con el etiquetado.

### 4.3 RECUENTO DE BACTERIAS

#### 4.3.1 RECUENTO DE FLORA TOTAL EN LECHE

Los recuentos de flora total en la leche se realizaron por el método de conteo total en placa de agar Plate Count (PCA Scharlau, Art. No. 01-161) para mesófilos aerobios mediante el uso de diluciones seriadas en agua de peptona (Peptona de caseína, Merck Cat. No. 1.07213.1000) al 0.1%, adaptado a cajas divididas en cuartos e inoculando cada cuarto con 20µL de muestra. Las cajas inoculadas se incubaron durante 24 - 48 horas y se realizó un conteo manual de las colonias individuales, considerando los cuartos de caja con menos de 100 unidades formadoras de colonia.

#### **4.3.2 RECUENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICA**

Los recuentos de bacterias ácido lácticas se realizaron por el método de conteo en palca de agar Man Ragosa Sharpe (MRS Scharlau, Art. No. 01-135) mediante el uso de diluciones seriadas en agua de peptona al 0.1%, adaptado a cajas divididas en cuartos e inoculando cada cuarto con 20 $\mu$ L de muestra. Las cajas inoculadas se incubaron durante 24 - 48 horas y se realizó un conteo manual de las colonias individuales, considerando los cuartos de caja con menos de 100 unidades formadoras de colonia.

#### **4.4 SELECCIÓN DEL INDICADOR DE pH Y EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LAS BACTERIAS AL INDICADOR DE pH**

Se consideraron indicadores de pH, con punto de viraje cercano 5.0, que no mostraran efecto inhibitor sobre las bacterias indicadoras y no tuvieran efectos tóxicos en humanos. El indicador se preparó al 0.2% (m/v) en NaOH 0.01M, y se adicionó a los medios de cultivo para tener una concentración final del 1.5%v/v (Vaikousi, Biliaderis, & Koutsoumanis, 2008). El indicador de pH utilizado fue: azul de bromotimol.

Para evaluar el crecimiento de los microorganismos en caldo MRS (MRS Scharlau, Art. No. 02-135) adicionado con el indicador de pH, se prepararon tubos de 5ml de MRS con el indicador de pH, y se inocularon con las cepas seleccionadas, se incubaron 24 horas a 37°C y se realizaron recuentos en placa por diluciones seriadas como se describe en el numeral 4.3.2, para evaluar el efecto del indicador sobre el crecimiento de las cepas; los recuentos se realizaron por triplicado para tres ensayos independientes y se compararon con el crecimiento en caldo MRS sin indicador utilizando una prueba estadística t con  $\alpha=0.05$ . Además se evaluó visualmente el cambio en el color del indicador con el crecimiento del microorganismo.

#### **4.5 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA BACTERIA INDICADORA**

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre las bacterias indicadoras se compararon los crecimientos en caldo MRS a 37°C después de 24 horas de incubación, y a 4°C después de 18 días de incubación (tiempo en el que se observó turbiedad en el medio) para el caldo MRS, y después de 21 días de incubación en MRS con el indicador de pH (tiempo en que se observó cambio de color en el indicador). Los inóculos utilizados para esta prueba se estiman en  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  UFC/mL. Las comparaciones se realizaron sobre la concentración final de microorganismos utilizando una prueba t ( $\alpha=0.5$ ).

#### **4.6 CINÉTICA DE DETERIORO DE LA LECHE**

Para establecer la cinética de deterioro de la leche se realizaron curvas de crecimiento microbiano a cuatro temperaturas que cubrieran el espectro de condiciones de almacenamiento y abuso para

la leche pasteurizada (12, 20, 28 y 37°C). Las temperaturas seleccionadas corresponden a un escenario pesimista en la temperatura de los refrigeradores (12°C) tanto comerciales como domésticos (Garrido, García-Jalón, & Vitas, 2010), y a temperaturas comunes en las diferentes regiones del país, también se consideró que a temperaturas por debajo de los 12°C, la microflora presente en la leche pasteurizada no alcanzó la población crítica de  $1 \times 10^5$  UFC/mL considerada en el estudio en los 14 días que se tienen como parámetro de inocuidad en varios países (Goff, 2011). Las curvas de crecimiento se realizaron en tres ensayos independientes, para dos leches pasteurizadas comerciales, teniendo como mínimo ocho puntos de muestra. Los recuentos se realizaron por duplicado de acuerdo al protocolo para el recuento de flora total en leche descrito en el numeral 4.3.1. Para la determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento ver el numeral 4.9. Adicionalmente se realizaron mediciones al pH de la leche por potenciometría (Potenciómetro Schott LI160/LAB180), siguiendo el mismo diseño experimental.

#### **4.7 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS INDICADORAS**

La cinética de crecimiento del microorganismo indicador se estableció a partir de curvas de crecimiento bacteriano a cuatro temperaturas (12, 20, 28 y 37°C), que cubrieron el espectro de temperaturas de almacenamiento y abuso para la leche pasteurizada, como se explica en el numeral 4.6. Las curvas de crecimiento se realizaron en caldo de cultivo MRS con el indicador de pH, con tres ensayos independientes, teniendo como mínimo ocho puntos de muestra. Los recuentos se realizaron, por duplicado de acuerdo con el protocolo para cuantificación de bacterias ácido lácticas descrito en el numeral 4.3.2. Para la determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento ver el numeral 4.9.

Adicionalmente se realizaron mediciones al pH del medio por potenciometría (Potenciómetro Schott LI160/LAB180), siguiendo el mismo diseño experimental.

#### **4.8 CINÉTICA DE CAMBIO DE COLOR DEL INDICADOR**

La cinética de cambio en el color del indicador se estableció a partir de mediciones de color en escala CIE Lab (Colorímetro ProQuest, Hunter Labs, USA). La configuración utilizada en el colorímetro fue FuentreSSS, 10°, con luz especular incluida. Las mediciones de color se realizaron siguiendo el mismo diseño experimental utilizado en la cinética de crecimiento de las bacterias indicadoras.

#### **4.9 DESCRIPCIÓN DE LAS CINÉTICAS DE CRECIMIENTO MICROBIANO**

La descripción de las curvas de crecimiento obtenidas se realizó con la aplicación DMFit (Baranyi & Roberts, 1994), ajustando el modelo de Gompertz modificado (Buchanan & Phillips, 1990) a los datos experimentales de crecimiento microbiano, (Ecuación 7). La selección del modelo de Gompertz se hizo con base a su amplia aplicación para describir de manera continua curvas de crecimiento microbiano y la fácil interpretación de sus parámetros. Además se tuvo en cuenta el

ajuste a los datos, la estimación de los parámetros del modelo, y la ausencia de diferencias evidentes frente a los ajustes del modelo D y del modelo bifásico

$$G(t) = A + C \cdot \left( \exp \left( -\exp(-B \cdot (t - M)) \right) \right)$$

**Ecuación 7:** Ecuación de Gompertz modificada (Buchanan & Phillips, 1990). Donde G(t) corresponde al logaritmo de la población en el tiempo t, A a la población inicial, C, al incremento en la población, B a la tasa máxima de crecimiento y M a la duración de la fase lag.

## 4.10 VALIDACIÓN DEL MODELO

### 4.10.1 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

Como parámetros de desempeño de los modelos se utilizaron el factor bias y el factor de exactitud propuestos por Ross (Ross, 1996), los cuales cuantifican la tendencia del modelo a subestimar o sobrestimar las respuestas, y la discrepancia entre los datos observados experimentalmente y los predichos por el modelo.

$$Factor\ bias = 10^{\frac{\sum \log(Predicho/Observado)}{n}}$$

**Ecuación 8:** Ecuación para la estimación del factor bias (Ross, 1996).

$$Factor\ de\ exactitud = 10^{\frac{\sum |\log(Predicho/Observado)|}{n}}$$

**Ecuación 9:** Ecuación para estimación del factor de exactitud (Ross, 1996)

### 4.10.2 VALIDACIÓN INTERNA

Se evaluó el desempeño del modelo obtenido con respecto a los datos experimentales, tanto del medio indicador como de la leche. Teniendo como datos observados los obtenidos experimentalmente y como datos predichos los generados por los modelos.

El mismo esquema de validación se utilizó para los modelos que describen los cambios de pH, los cambios en el parámetro ΔE correspondiente al cambio de color, así como para validar el comportamiento del modelo en condiciones dinámicas de temperatura donde se compararon los tiempos para alcanzar una población microbiana de riesgo ( $1 \times 10^5$  UFC/mL) y los tiempos de respuesta del indicador (ΔE=8).

La validación en condiciones dinámicas de temperatura se realizó utilizando la ecuación de Gompertz modificada en su forma diferencial que de acuerdo con Huang (2003) se puede expresar de la forma que muestra la Ecuación 10. El proceso de validación se realizó teniendo en cuenta 10 perfiles de temperatura diferentes generados aleatoriamente dentro del rango de temperatura del modelo, a partir de una distribución normal con media 12°C desviación estándar 25°C para cubrir el rango de temperatura del modelo (12°C-37°C); en los casos en que la temperatura



obtenida aleatoriamente fuera inferior a 12°C, se forzó a que tomara el valor de 12°C como temperatura para desarrollar la simulación. Adicionalmente se generaron 10 series de temperatura, correspondientes a situaciones realistas de transporte y consumo de leche, teniendo en cuenta los rangos de temperatura donde el modelo es aplicable. La resolución la Ecuación 10 de forma numérica continua se realizó utilizando herramientas de dinámica de sistemas (Vensim PLE V.5.10e).

$$\frac{dG}{dt} = B \cdot (G - A) \cdot \ln\left(\frac{C}{G - A}\right)$$

**Ecuación 10: Forma diferencial de la ecuación de Gompertz modificada (Huang, 2003).**

#### **4.10.3 VALIDACIÓN EXTERNA**

Se evaluó el desempeño del modelo obtenido con respecto al comportamiento de microorganismos patógenos en leche (*L. monocytogenes* y *E. coli*). Los datos de crecimiento para los microorganismos patógenos se obtuvieron de 10 simulaciones en el Pathogen Modeling Program (PMP V.7.0) con un inóculo inicial de  $1 \times 10^3$  UFC/mL, pH de 6.5 y NaCl al 0.5%, que corresponden a las condiciones más cercanas a las de la leche que se pueden simular con el software. La variable de respuesta fue el tiempo para alcanzar un incremento de la población de 2 ciclos logarítmicos ( $1 \times 10^5$  UFC/mL) y se comparó con el tiempo necesario para alcanzar un  $\Delta E=8$ .

## 5 RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 5.1 SELECCIÓN DE LOS COMPONENTES ESTRUCTURALES DEL TTI

#### 5.1.1 ESTANDARIZACIÓN DE LOS INÓCULOS

La estandarización del inóculo tenía como fin establecer cultivos microbianos reproducibles para la obtención de inóculos de características iguales. La Tabla 5, muestra la concentración de las bacterias ácido lácticas después del subcultivo y la variabilidad observada entre las réplicas.

**Tabla 5: Resumen de los recuentos para la estandarización del inóculo.**

BACTERIA	RECIENTOS Log(UFC/mL)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VARIANZA
<i>Lactobacillus plantarum</i>	9.34	0.55	0.30
<i>Pediococcus acidilactis</i>	9.36	0.43	0.19
<i>Lactobacillus brevis</i>	9.64	0.31	0.09

Los resultados de la estandarización del inóculo mostraron que no hay diferencias significativas (ANOVA  $\alpha=0.05$ ), entre las tres cepas consideradas para el estudio. Los recuentos finales obtenidos están en orden de  $1 \times 10^9$  UFC/mL, cantidad que es consistente con otros experimentos realizados en el laboratorio y con datos reportados en la bibliografía (Ellouze, y otros, 2008; Fu, Taoukis, & Labuza, 1991).

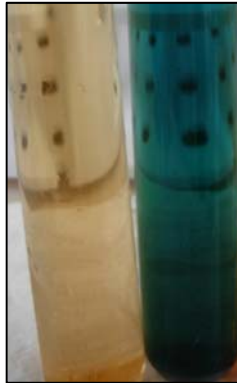
#### 5.1.2 SELECCIÓN DEL INDICADOR DE pH

Después de comparar las características de varios indicadores que cumplieran la con la condición de no toxicidad y con el rango de pH para el cambio de color se seleccionó el azul de bromotimol. La Tabla 6 muestra las características del azul de bromotimol incluyendo los rangos de pH donde se da el viraje de color y los colores correspondientes.

**Tabla 6: Rango y colores de viraje del azul de bromotimol.**

RANGO DE pH DONDE SE DA EL VIRAJE	COLOR INICIAL	COLOR DESPUÉS DEL VIRAJE
5.4 – 3.8	AZUL	VERDE/AMARILLO

El indicador de pH debe dar una señal con el cambio de color apreciable para el consumidor y que se pueda relacionar con el crecimiento de microorganismos en la leche, al comparar los colores iniciales (Gráfica 3) con los obtenidos después de 24h a 37°C (Gráfica 4), el indicador de pH genera una señal clara y reconocible, al dar más tiempo para el crecimiento del microorganismo indicador se alcanzó el cambio completo a un color amarillo.



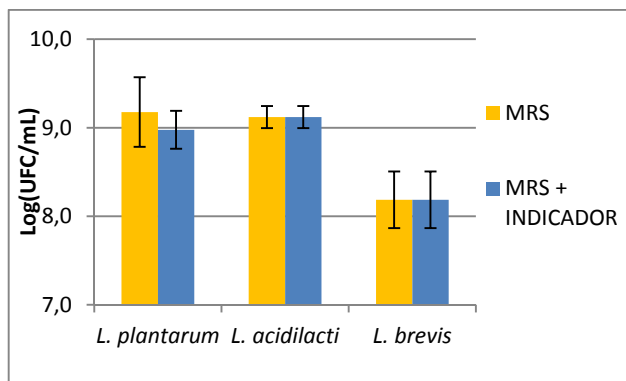
Gráfica 3: Medio de cultivo MRS y MRS con el indicador de pH.



Gráfica 4: Medio de cultivo MRS y MRS con el indicador de pH inoculados con *L. plantarum*, después de 24 horas de incubación a 37°C.

### 5.1.3 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS EN MRS ADICIONADO CON LOS INDICADORES pH

Al evaluar el crecimiento de las cepas en MRS con el indicador de pH y comparar los recuentos obtenidos con los obtenidos en MRS, después de 24 horas de incubación a 37°C, no se observaron diferencias significativas (Prueba t,  $\alpha=0.05$ ) en los recuentos de las bacterias estudiadas. La Gráfica 5 muestra los recuentos obtenidos para las tres cepas.

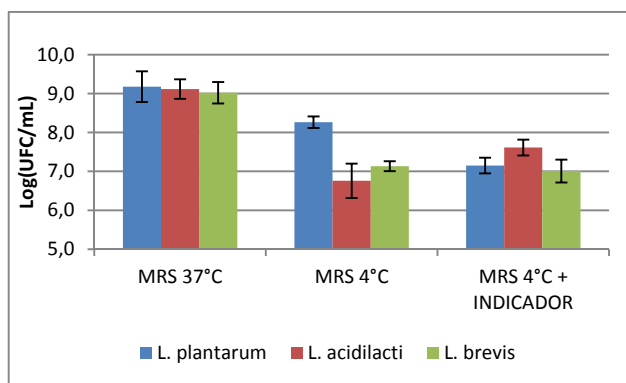


Gráfica 5: Recuentos comparativos para las tres cepas en MRS y MRS con el indicador de pH, después de 24h de incubación a 37°C.

Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3).

#### 5.1.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS

Se evaluó y comparó el crecimiento de las tres bacterias a 37°C y en condiciones de refrigeración (Incubación en nevera 4°C). Los resultados mostraron un efecto significativo y negativo sobre el crecimiento de las tres cepas en condiciones de refrigeración, se evidenció que el efecto de la temperatura fue menor para *L. plantarum*, pero no se observan diferencias significativas al comparar el crecimiento de las tres cepas en presencia del indicador de pH a 4°C; Gráfica 6.



Gráfica 6: Crecimiento de las bacterias indicadoras a 37°C y 4°C, en MRS y en MRS con el indicador de pH, después de 24h de incubación a 37°C, 18 días de incubación a 4°C para MRS y 21 días de incubación para MRS con el indicador de pH

Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3).

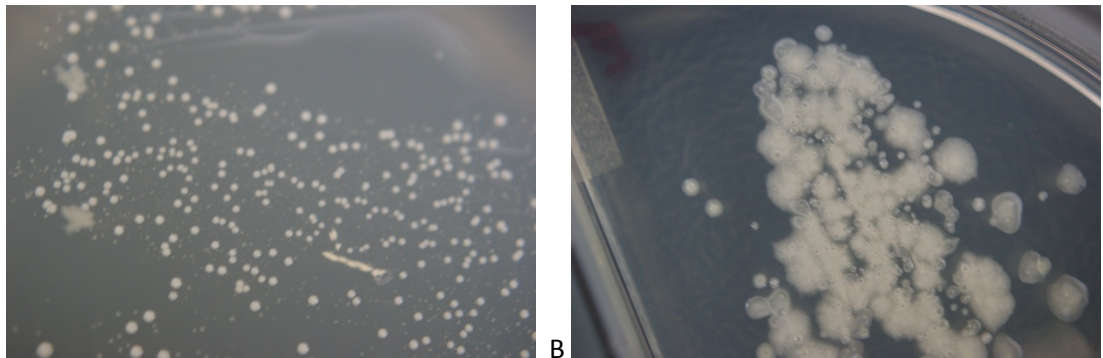
Considerando los resultados de los apartados 5.1.2, 5.1.3 y 5.1.4, se consideró que la combinación del azul de bromotimol y *L. plantarum*, ofrece condiciones adecuadas para la evaluación de las cinéticas de cambio del indicador.

## 5.2 OBTENCIÓN DE MODELOS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO Y DE RESPUESTA DEL INDICADOR

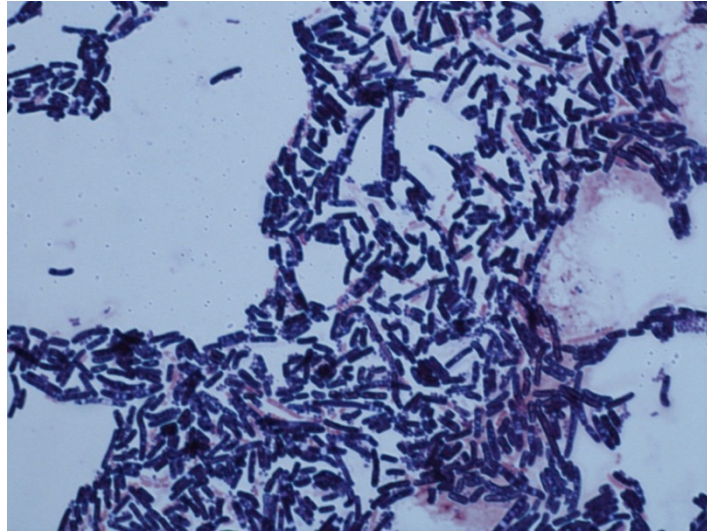
### 5.2.1 MODELO DEL CRECIMIENTO DE LA MICROFLORA PRESENTE EN LECHE PASTEURIZADA A DIFERENTES TEMPERATURAS

Las leches evaluadas corresponden a dos marcas comerciales y se denominan en el presente estudio como leche A y leche B.

Las colonias observadas en las cajas de recuento de las dos leches muestran una variedad de microorganismos que eventualmente pueden generar diversidad en los crecimientos y en los fenómenos de deterioro observados; coagulación por acidificación, coagulación no ácida (sweet curling en inglés). Adicionalmente y aunque no se realizaron estudios cuantitativos en este sentido se evidenciaron variaciones en la flora predominante entre las leches A y B, y en las diferentes temperaturas estudiadas. La Gráfica 7 muestra las colonias obtenidas sobre agar MRS de las dos leches a 28°C, y la Gráfica 8 muestra una tinción de Gram para la Leche A en las mismas condiciones. Evidenciando la variabilidad estipulada anteriormente, en la gráfica de la tinción de Gram se ve la presencia de diferentes morfologías y tipos de microorganismos.



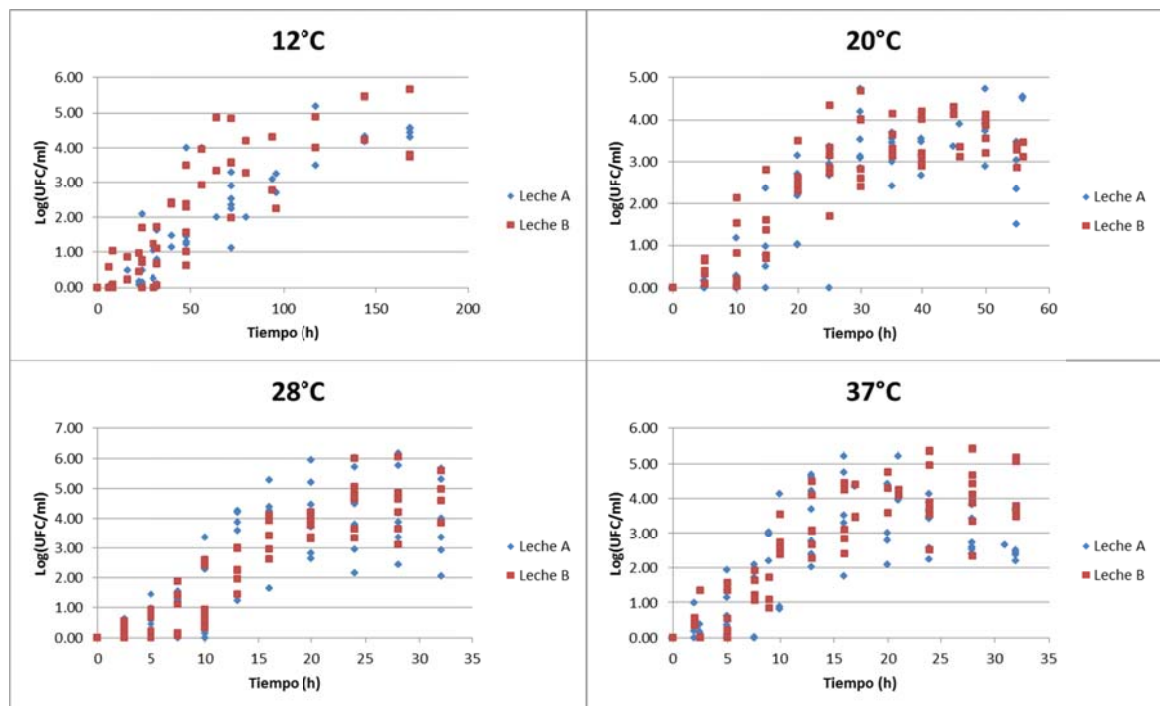
Gráfica 7: Fotografías de las colonias observadas en las leches A y B a 28°C.



**Gráfica 8: Tinción de Gram para la leche A, a 28°C. Azul-Morado Gram positivas, Rosado-Rojo Gram negativas.**

Las leches presentaron comportamientos similares, con crecimiento sigmoide de la microflora presente, y coherentes con los cambios de temperatura realizados, mostrando una mayor velocidad en el incremento de la flora microbiana en la medida en que se aumenta la temperatura y una reducción en la duración de la fase lag. La carga inicial de microorganismo detectada fue de  $3.55 \pm 0.73 \text{ Log(UFC/mL)}$  y  $3.30 \pm 0.64 \text{ Log(UFC/mL)}$  para las leches A y B respectivamente, y alcanzaron poblaciones entre  $9.0 \text{ Log(UFC/mL)}$  para  $37^\circ\text{C}$  y  $7.5 \text{ Log(UFC/mL)}$  para  $12^\circ\text{C}$ .

Las curvas de crecimiento microbiano de las dos leches a diferente temperatura (Gráfica 9) mostraron un comportamiento coherente con incremento en la velocidad de crecimiento en la medida que se incrementa la temperatura. Muestran una variabilidad apreciable entre los ensayos independientes, particularmente en los crecimientos finales observados ( $6.5 \text{ Log(UFC/mL)}$  –  $9.1 \text{ Log(UFC/mL)}$ ). Este fenómeno se puede atribuir a diferencias en el manejo del producto previo a la compra, como tiempos de espera en muelles de descargue, temperaturas de almacenamiento en bodega y en los anaqueles entre otros. La variabilidad en el manejo previo a la compra, puede influir en la microflora presente en el producto; tanto en cantidad como en el tipo de microorganismos, y esto eventualmente afecta las respuestas observadas en el laboratorio.



Gráfica 9: Curvas de crecimiento de la microflora presente en la leche A y B en las condiciones experimentales.

La Gráfica 9 y la Tabla 7 muestran las curvas de crecimiento y la bondad de ajuste del modelo de Gompertz modificado a los datos experimentales respectivamente. El ajuste fue satisfactorio con valores de  $R^2$  entre 0.98 y 0.69, con desviaciones estándar entre 0.82 y 0.34 Log(UFC/mL) para la leche A, y  $R^2$  entre 0.96 y 0.80, con desviaciones estándar entre 0.95 y 0.35 Log(UFC/mL) para la leche B. Sin embargo, el ajuste de los datos en cuatro casos (Series con \* en la Tabla 7) presentaron ajustes donde alguno de los parámetros ( $\mu$ , Lag) presentó un error estándar superior al 100%, esta condición está asociada a la variabilidad observada en los datos lo que puede dificultar el ajuste del modelo, adicionalmente la variabilidad en las poblaciones microbianas afecta los recuentos en los tiempos en que termina la fase lag incrementando el error estándar en el ajuste.

Para los análisis posteriores estos datos se descartaron. En la Tabla 7 se observa la variabilidad en la duración de la fase lag y el incremento de la población alcanzado ( $Y_{max}=4.03\pm 0.88$  Log(UFC/ml)) entre los ensayos independientes. Dado que las cinéticas de deterioro se pueden describir adecuadamente a partir de la tasa de crecimiento de los microorganismos en el producto (Vaikousi, Biliaderis, & Koutsoumanis, 2008) los análisis posteriores se realizaron sobre el parámetro  $\mu$ .

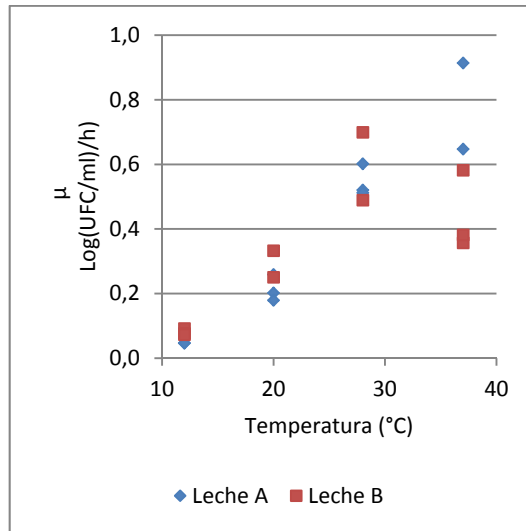
**Tabla 7: Parámetros y bondad de ajuste de la ecuación de Gompertz modificada a los datos de crecimiento microbiano de la leche A y B. Donde SE( ) corresponde al error estándar de las estimaciones.**

**\* Series de datos con error estándar en uno de los parámetros superior al 100%**

Leche	Temperatura (°C)	Ensayo	$\mu$	SE ( $\mu$ )	Lag	SE (Lag)	$Y_{max}$	SE ( $Y_{max}$ )	SE (fit)	$R^2$
A	37	1*	6.41	$3.28 \times 10^7$	8.60	$2.05 \times 10^6$	3.86	0.19	0.64	0.87
		2	0.91	0.47	9.09	0.56	2.59	0.10	0.37	0.92
		3	0.65	0.31	3.78	1.61	3.88	0.26	0.80	0.79
	28	1	0.52	0.05	5.00	0.72	5.87	0.16	0.34	0.98
		2	0.60	0.43	10.49	1.99	2.70	0.19	0.54	0.83
		3	0.51	0.11	4.05	1.11	4.02	0.16	0.46	0.92
	20	1	0.20	0.03	9.50	2.17	4.25	0.19	0.39	0.95
		2	0.26	0.12	11.28	3.61	3.47	0.26	0.76	0.77
		3	0.18	0.11	13.25	5.96	3.10	0.41	0.85	0.70
B	12	1*	2.67	$2.53 \times 10^8$	39.65	$3.27 \times 10^7$	2.97	0.37	0.80	0.69
		2	0.05	0.01	26.50	14.56	5.19	0.72	0.52	0.92
		3	0.05	0.01	15.95	11.64	4.60	0.33	0.35	0.96
	37	1	0.58	0.27	7.26	1.11	3.69	0.16	0.53	0.91
		2	0.36	0.04	3.90	0.81	3.69	0.11	0.30	0.96
		3	0.38	0.05	1.72	1.64	5.14	0.19	0.40	0.95
	28	1*	0.28	0.03	0.40	3.46	5.85	0.46	0.42	0.96
		2	0.70	0.23	10.90	0.97	4.04	0.17	0.44	0.94
		3	0.49	0.13	8.63	1.23	4.03	0.27	0.53	0.91
20	1*	0.13	0.03	0.00	7.71	3.38	0.22	0.43	0.88	
	2	0.33	0.10	9.26	2.00	3.72	0.16	0.52	0.89	
	3	0.25	0.09	11.87	2.99	3.67	0.25	0.64	0.85	
12	1	0.09	0.02	13.41	6.61	4.10	0.42	0.50	0.90	
	2	0.08	0.03	22.95	13.42	4.41	0.49	0.88	0.80	
	3	0.07	0.02	45.98	10.89	4.58	0.42	0.59	0.90	

Al comparar el comportamiento del parámetro  $\mu$  entre las dos leches se observó que en la leche B el parámetro es “mayor” a 28°C ( $0.59 \pm 0.15$  Log(UFC/mL)/h) que a 37°C ( $0.44 \pm 0.12$  Log(UFC/mL)/h). Este fenómeno indica que la microflora predominante en la leche B puede tener las condiciones óptimas de crecimiento entre 28°C y 37°C; lo que indica una mezcla de poblaciones entre mesófilas y psicrótrofas, mientras que para la leche A ese óptimo no se puede estimar en las condiciones experimentales al no evidenciar un punto de inflexión. Dado que el valor del parámetro  $\mu$  a 37°C para la leche A ( $0.78 \pm 0.19$  Log(UFC/mL)/h) es mayor que para la leche B ( $0.44 \pm 0.12$  Log(UFC/mL)/h); indicando que la microflora presente en la leche A es predominantemente mesófila y por lo tanto crece más rápido, para los análisis posteriores se consideraron los datos de la leche A que corresponden a las condiciones de peor escenario en el experimento realizado.





**Gráfica 10: Comparación de la tasa de crecimiento de la microflora entre la leche A y B.**

Considerando el parámetro  $\mu$  se identificó una tendencia lineal respecto a la temperatura (Gráfica 10), para efectos de modelamiento esa correlación corresponde a la Ecuación 11, con un  $R^2=0.92$ . En estas condiciones  $\mu$  alcanza el valor de 0 a  $11.54^\circ\text{C}$ , lo que indica que por debajo de esa temperatura no se presentaría crecimiento microbiano en la leche y en consecuencia los fenómenos de deterioro a temperaturas inferiores serían de tipo químico; como proteolíticos, oxidativos o lipolíticos. El no crecimiento de los microorganismos no implica la muerte de los mismos, pueden permanecer viables pero no tienen la capacidad de reproducirse. La correlación correspondiente a la Ecuación 11 es válida solo dentro del rango del modelo. El comportamiento esperado para  $\mu$  corresponde al de un fenómeno con un máximo parcial, sin embargo, ese fenómeno no fue observado y dado que en la leche se encuentra una variedad importante de microorganismos, es posible que identificar ese "óptimo" y describir el comportamiento de  $\mu$  con un modelo cuadrático no sea práctico o no sea posible.

$$\mu = 0.031 \cdot T - 0.36$$

**Ecuación 11: Ajuste del modelo lineal a los datos de  $\mu$  de la leche. Donde T corresponde a la temperatura en  $^\circ\text{C}$ .**

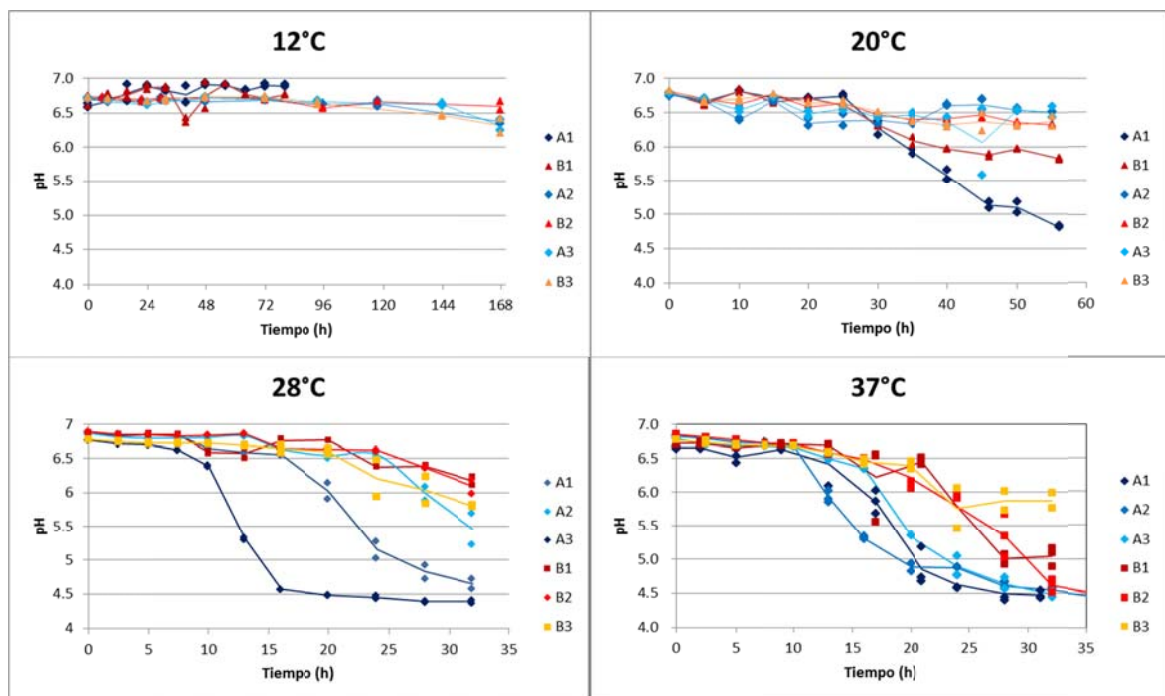
$$Lag = 0.037 \cdot T^2 - 2.40 \cdot T + 44.70$$

**Ecuación 12: Ajuste del modelo cuadrático a los datos de duración de la fase lag de la leche. Donde T corresponde a la temperatura en  $^\circ\text{C}$ .**

El efecto de la temperatura en la duración de la fase lag fue coherente con el comportamiento de microorganismos mesófilos; a medida que la temperatura desciende la duración de la fase lag se incrementa, teniendo como duración mínima las condiciones óptimas para el crecimiento de los microorganismos. El ajuste para la duración de la fase lag a un modelo cuadrático (Ecuación 12) mostro un  $R^2=0.75$  con un mínimo a  $32.41^\circ\text{C}$  correspondiente a una duración de la fase lag de 5.73

horas. El efecto sobre el incremento del microorganismo ( $Y_{max}$ ) no presentó una tendencia definida frente a la temperatura, para efectos del modelo y consideraciones posteriores se tomará como valor de crecimiento el promedio observado correspondiente a  $3.97 \pm 1.06$  Log(UFC/mL). El comportamiento observado es consistente con la variabilidad observada en los recuentos iniciales de las leches y con la variabilidad de microorganismos observados en las siembras.

El pH presentó un comportamiento variable, parcialmente consistente con el crecimiento observado (Gráfica 11), siendo evidente a mayor temperatura, y poco perceptible a bajas temperaturas (12°C). Este comportamiento fue consistente y se explican en la medida en que no toda la población microbiana detectada en los recuentos corresponde a bacterias ácido lácticas, o bacterias que produzcan ácido en su metabolismo; como *Pseudomonas* y otras bacterias proteolíticas. Pese a la ausencia de ácido, se observaron fenómenos de deterioro: formación de grumos y olor desagradable, en el producto. Adicionalmente este fenómeno fue consistente con la variabilidad de las colonias observadas en las cajas de MRS y con la variabilidad observada en las curvas de crecimiento.



Gráfica 11: Curvas de reducción del pH en la leches A y B.

## 5.2.2 VALIDACIÓN DEL MODELO DE CRECIMIENTO PARA DETERIORO DE LA LECHE

El modelo de crecimiento para deterioro de la leche incorpora el valor de los parámetros obtenidos en la Ecuación 11 y Ecuación 12 al modelo modificado de Gompertz para predecir el crecimiento observado. La validación del modelo permite establecer el desempeño del modelo y si

es viable su utilización para la predicción de deterioro de la leche. Para evaluar el modelo se consideraron los parámetros propuestos por Ross (1996), para cada una de las leches de manera independiente y para el conjunto de datos de las dos leches como se muestra en la Tabla 8.

Con los valores obtenidos para los dos factores (bias y exactitud) se puede afirmar que el modelo se puede aplicar con seguridad para predecir el crecimiento microbiano asociado el deterioro de leche, teniendo presente que el modelo tiende a ser inseguro seguro por defecto, en promedio las predicciones son un 8% superiores al valor observado, en general el modelo predice con una exactitud el 87%. Desempeños similares han sido reportados como aceptables por Salter, Ross, y McMeekin (1998) en aplicaciones para *E. coli*, en cordero, Skandamis y Nychas (2000) para ensalada de berenjena, y por Pinon, y otros (2004) en la validación de modelos cardinales.

**Tabla 8: Evaluación del desempeño del modelo de deterioro para la leche A y B, y para el conjunto total de datos.**

	Factor bias	Factor de exactitud
Total	1.08	1.17
Leche A	1.10	1.17
Leche B	1.06	1.16

En el comportamiento de los factores bias y de exactitud en las dos leches utilizadas, se observó el mismo comportamiento del conjunto total de datos (Tabla 8), donde los dos modelos son inseguros por defecto. Sin embargo el modelo para la leche B mostró un mejor ajuste con predicciones en promedio un 6% superior a los datos observados frente al 10% observado en el modelo para la leche A, y una desviación global del 16%, frente al 17% del modelo para la leche A.

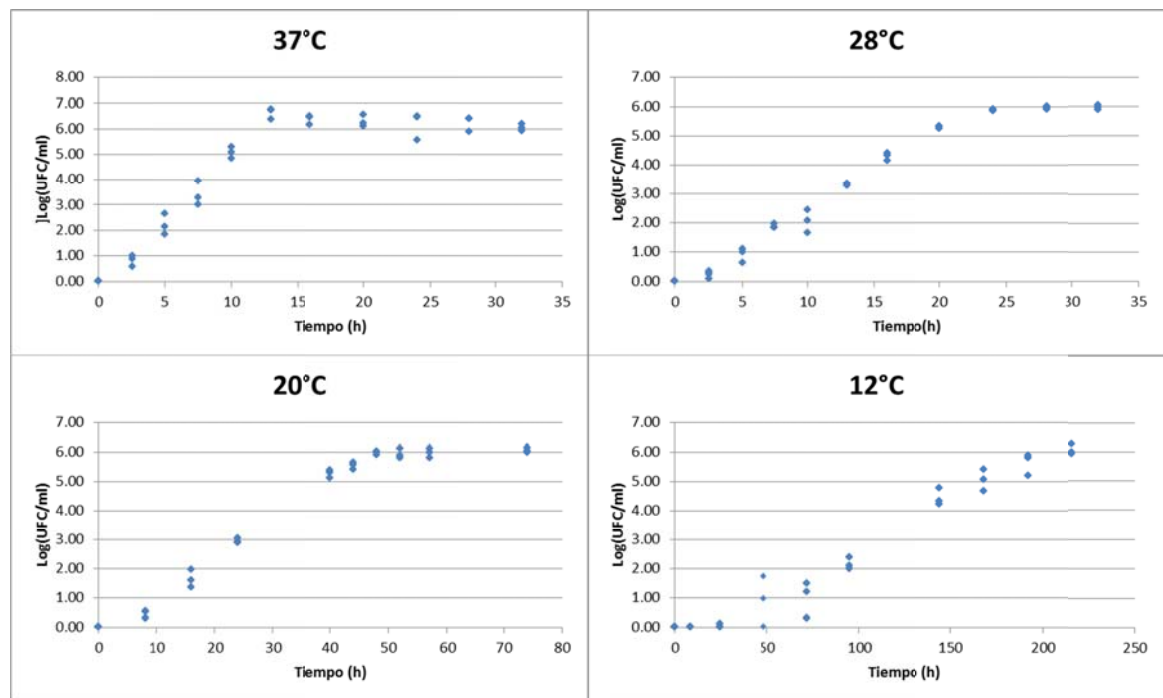
### **5.2.3 MODELO DEL CRECIMIENTO DE LA CEPA COMPONENTE DEL INDICADOR A DIFERENTES TEMPERATURAS**

El crecimiento de la cepa de *L. plantarum* en MRS con el indicador de pH fue consistente y presentó poca variabilidad entre los ensayos independientes, en las cuatro temperaturas experimentales, siendo evidente el cambio en las tasas de crecimiento del microorganismo, que se observaron más lentas a menor temperatura (Gráfica 12). Se alcanzó en todos los casos un crecimiento de seis ciclos logarítmicos. Dadas las características del experimento, solo en las curvas de crecimiento realizadas a 12°C se observó de manera evidente la presencia de una fase lag. El análisis del ajuste del modelo de crecimiento del indicador a la ecuación de Gompertz modificada se muestra en la Tabla 9, con valores de R<sup>2</sup> entre 0.97 y 1.00 y desviaciones estándar entre 0.15 y 0.47 Log(UFC/mL). Una de las series de datos a 12°C mostro un error estándar superior al 100%, para la duración de la fase lag, siendo mucho menor que en los otros ensayos, por lo que la serie no fue considerada en los análisis posteriores. El crecimiento de microorganismos alcanzado  $6.36 \pm 0.28$  Log(UFC/mL), corresponde a una densidad de del orden de  $1 \times 10^9$  UFC/mL, que es normal para bacterias ácido lácticas.

**Tabla 9: Bondad de ajuste de la ecuación de Gompertz modificada a los datos de crecimiento de la cepa A en MRS con indicador. Donde SE ( ) corresponde al error estándar de las estimaciones.**

**\* Series de datos con error estándar en uno de los parámetros superior al 100%.**

Temperatura	Ensayo	$\mu$	SE ( $\mu$ )	Lag	SE (Lag)	$Y_{max}$	SE ( $Y_{max}$ )	SE(fit)	$R^2$
37	1	0.81	0.14	3.26	0.86	6.02	0.18	0.39	0.97
	2	0.76	0.15	3.06	1.10	6.55	0.23	0.47	0.97
	3	0.77	0.11	1.75	0.94	6.43	0.17	0.36	0.98
28	1	0.37	0.05	4.06	1.66	6.38	0.37	0.34	0.98
	2	0.34	0.02	2.03	1.37	6.39	0.24	0.20	0.99
	3	0.36	0.03	3.14	1.36	6.38	0.27	0.25	0.99
20	1	0.20	0.01	8.72	1.40	6.13	0.13	0.15	1.00
	2	0.19	0.02	6.88	2.21	6.34	0.19	0.21	0.99
	3	0.22	0.02	10.40	1.36	6.27	0.13	0.16	1.00
12	1	0.06	0.01	63.98	6.67	6.03	0.40	0.26	0.99
	2*	0.04	0.01	14.43	39.16	8.28	2.74	0.41	0.97
	3	0.05	0.00	44.35	6.50	7.05	0.44	0.20	0.99



**Gráfica 12: Curvas de crecimiento del indicador en las condiciones experimentales.**

El efecto de la temperatura sobre los parámetros  $\mu$  y duración de la fase lag se evaluó por medio de correlaciones. Se ajustó a un modelo de raíz cuadrada para  $\mu$  (Ecuación 13) con un  $R^2=0.98$  y se ajustó a un modelo exponencial para a duración de la fase lag (Ecuación 14), con un  $R^2=0.77$ . En el crecimiento observado no se evidenció ninguna tendencia, por lo que para efectos del modelo se utilizó el promedio observado,  $6.36 \pm 0.28$  Log(UFC/mL), en las etapas posteriores.

$$\sqrt{\mu} = 0.026 \cdot T - 0.081$$

$$\mu = (0.026 \cdot T - 0.081)^2$$

Ecuación 13: Ajuste del modelo de raíz cuadrada a los datos de  $\mu$  de la cepa A con indicador. Donde T corresponde a la temperatura en °C.

$$\ln(Lag) = 4.75 - 0.11 \cdot T$$

$$Lag = e^{4.75-0.11 \cdot T}$$

Ecuación 14: Ajuste del modelo logarítmico a los datos de duración de la fase Lag para la cepa A con indicador. Donde T corresponde a la temperatura en °C.

#### 5.2.4 VALIDACIÓN DEL MODELO DE CRECIMIENTO PARA EL INDICADOR

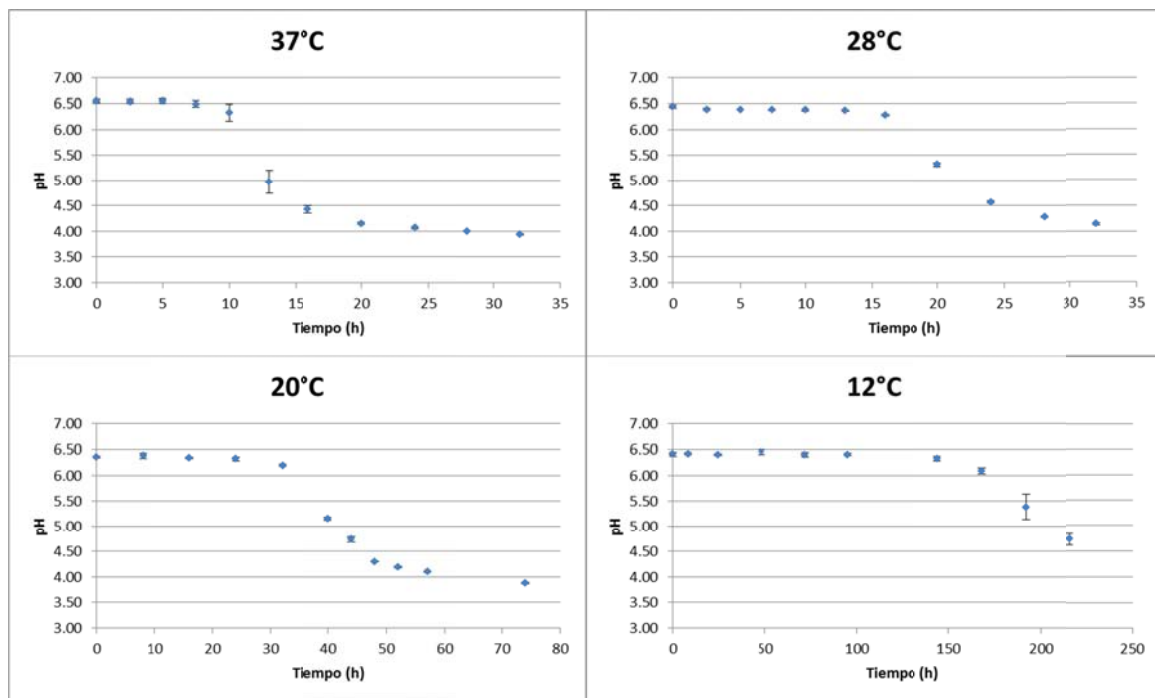
La validación del modelo se realizó teniendo en cuenta los criterios anteriormente descritos, factor bias y factor de exactitud. Los valores de 1.21 para el factor bias, y de 1.22 para el factor de exactitud muestran un desempeño aceptable. Estos resultados indican una tendencia a sobre estimar los resultados en un 21% y una desviación general del 22%.

Considerando los resultados el modelo es viable y describe de manera satisfactoria el crecimiento del microorganismo indicador. Sin embargo es conveniente tener presente estos resultados ya que la tendencia a sobre estimar el crecimiento puede generar estimaciones sesgadas y predicciones de fin de la vida útil del producto de manera anticipada.

#### 5.2.5 MODELO PARA EL CAMBIO DEL pH DEL INDICADOR

El crecimiento del microorganismo indicador produjo un cambio del pH del medio de cultivo (Gráfica 13). El cambio de pH se evidencia en una reducción progresiva que coincidió con la finalización de la fase de crecimiento exponencial del microorganismo. Este fenómeno es deseable para el diseño de un TTI, ya que permite ajustar y modular la respuesta del mismo de acuerdo a las características y condiciones de crecimiento del microorganismo indicador.

Dadas las características de las curvas observadas, con un hombro prolongado y una caída súbita, se ajustó un modelo que presentara ese comportamiento y que tuviera un significado biológico. A estas características se ajusta la ecuación propuesta por Geeraerd, Herremans, y Van Impe (2000), que describe fenómenos de inactivación microbiana que presentan diferentes características como la presencia de hombros, reducción lineal y colas. La ecuación en función de las variables experimentales se muestra en la Ecuación 15, donde  $k_{max}$  representa la velocidad de cambio en el pH de acuerdo con la concentración del microorganismo en Log(UFC/mL), y  $SP$  representa la población necesaria para que inicie un cambio de pH en el medio de cultivo.



Gráfica 13: Curvas de pH para el indicador en las condiciones experimentales. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3).

$$pH = pH_0 \cdot \exp\left(-k_{max} \cdot \log\left(\frac{UFC}{mL}\right)\right) \cdot \frac{\exp(k_{max} \cdot SP)}{1 + (\exp(k_{max} \cdot SP) - 1) \cdot \exp\left(-k_{max} \cdot \log\left(\frac{UFC}{mL}\right)\right)}$$

Ecuación 15: Ecuación de hombro y reducción lineal (Geeraerd, Herremans , & Van Impe, 2000), parametrizada para pH y concentración en Log(UFC/mL). Donde  $k_{max}$  corresponde a la velocidad de cambio en el pH de acuerdo con la concentración del microorganismo en Log(UFC/mL), y  $SP$  a la población necesaria para que inicie un cambio de pH en el medio de cultivo.

La Tabla 10 muestra los resultados de la estimación de los parámetros  $k_{max}$  y  $SP$ , para las temperaturas de estudio y para el conjunto global de datos. A partir de los resultados se consideró trabajar con la estimación del conjunto total de datos que ofrece un ajuste adecuado sin considerar el efecto de la temperatura, ya que no se pudo establecer una correlación entre la temperatura y el cambio de los parámetros de la Ecuación 15, y a que el ajuste global describe de manera satisfactoria el comportamiento del pH respecto a la concentración de microorganismos.

Tabla 10: Estimación de parámetros y bondad de ajuste para la relación entre pH y la concentración de microorganismo en Log(UFC/mL).

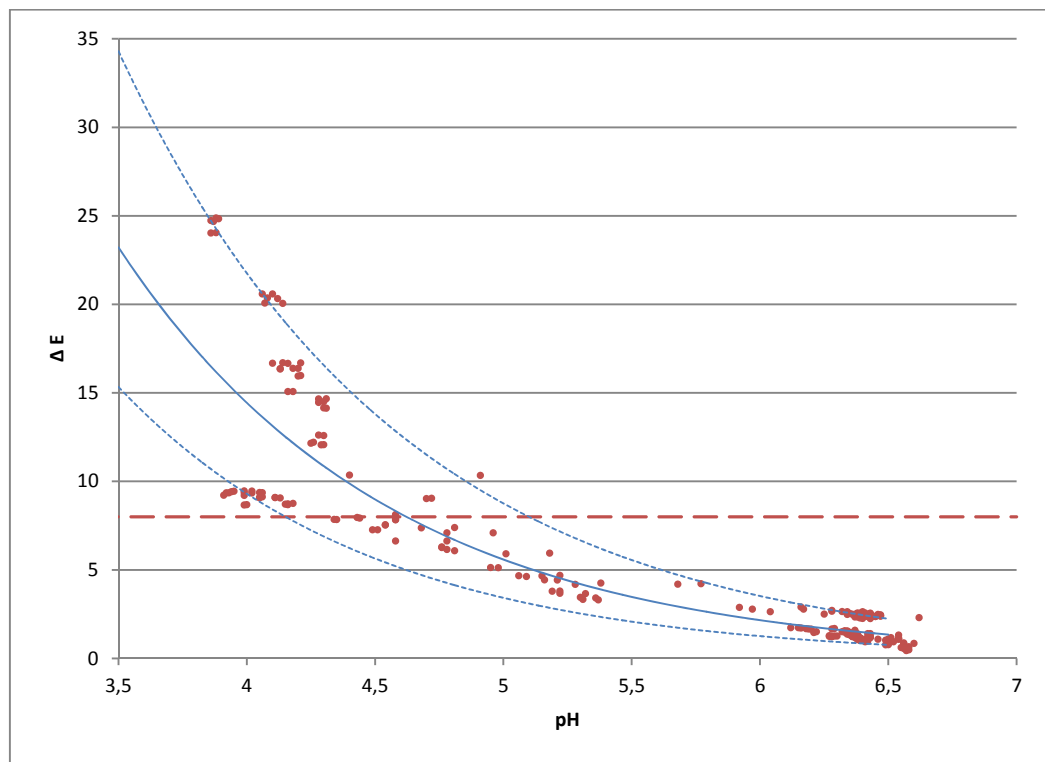
Temperatura (°C)	37	28	20	12	Global
$k_{max}$	4.10 (0.14)	3.66 (0.31)	3.49 (0.29)	3.57 (0.10)	3.39 (0.15)
$SP$	7.99 (0.04)	7.88 (0.11)	7.97 (0.11)	7.78 (0.03)	7.82 (0.06)
$R^2$	0.80	0.99	0.99	0.99	0.99

### 5.2.6 MODELO PARA EL CAMBIO DE COLOR A PARTIR DEL pH DEL INDICADOR

El cambio de color del indicador está asociado al cambio de pH en el medio de cultivo. La Gráfica 14 muestra el comportamiento del parámetro  $\Delta E$ ; que corresponde al cambio de color respecto al pH medido en las muestras, y muestra el ajuste de un modelo exponencial que corresponde a la Ecuación 16. El análisis de la relación entre el cambio de color  $\Delta E$  y el pH arrojó una correlación exponencial con un  $R^2=0.99$ .

$$\ln(\Delta E) = 6.47 - 0.95 \cdot pH$$
$$\Delta E = e^{6.47-0.95 \cdot pH}$$

Ecuación 16: Correlación del cambio de color y el pH del indicador.



Gráfica 14: Correlación entre el pH y el  $\Delta E$ . La línea sólida corresponde a la predicción del modelo, las líneas punteadas al intervalo de confianza del 95% y la línea horizontal un  $\Delta E=8$  fijado como cambio de color de referencia.

### 5.2.7 AJUSTE DEL INÓCULO INICIAL DEL INDICADOR PARA UNA RESPUESTA ADECUADA

La forma más sencilla de modular la respuesta de in TTI es a través del inóculo inicial del indicador. La cantidad de microorganismos que se coloca inicialmente en el dispositivo permite ajustar la respuesta a tiempos y temperaturas deseadas. El efecto del inóculo inicial se evaluó de manera teórica a través de un modelo que involucró de manera simultánea la Ecuación 11, Ecuación 12, Ecuación 13, Ecuación 14, Ecuación 15 y Ecuación 16 comparando los tiempos necesarios para

inducir un cambio de pH, que se estableció en una población de  $5 \times 10^7$  UFC/mL, y los tiempos necesarios para que la microflora de la leche alcance una población de  $1 \times 10^5$  UFC/mL, valor considerado como la dosis infectiva para varios microorganismos (U.S. Food and Drug Administration, 2009). Para efecto de esta etapa se consideró una población inicial en la leche de  $1 \times 10^3$  UFC/mL, que es un ciclo logarítmico inferior al valor establecido por la ley 616 de 2006 (Ministerio de la Protección Social, 2006) para que la leche pasteurizada sea comercializable que es de  $1 \times 10^4$  UFC/mL al momento de consumo.

A partir de los supuestos planteados, población que genera un cambio de pH y nivel crítico de los microorganismos, se optimizó el inóculo inicial del indicador haciendo que la sumatoria del valor absoluto de las diferencias entre los tiempos de respuesta y los tiempos para alcanzar la población de  $1 \times 10^5$  UFC/mL en la leche, fuera mínima considerando las cuatro temperaturas dentro del rango del modelo (12, 20, 28, y 37°C). El inóculo inicial del indicador establecido en estas condiciones fue de 7.25 Log(UFC/mL). Las simulaciones que se desarrollaron para la validación del TTI se hicieron con este valor como inóculo inicial.

### **5.2.8 RELACIÓN ENTRE EL CRECIMIENTO DE LA FLORA MICROBIANA EN LECHE PASTEURIZADA Y LA RESPUESTA DEL INDICADOR**

Para relacionar la respuesta de un indicador como un TTI y los fenómenos de deterioro del producto Fu, Taoukis, y Labuza (1992), propusieron que es conveniente tener energías de activación similares entre las reacciones de deterioro y las reacciones del indicador. Vaikousi, Biliaderis, y Koutsoumanis (2008) relacionaron la velocidad de deterioro ( $\mu$ ) con el recíproco del tiempo final o de respuesta del indicador, de tal forma que al graficar el logaritmo natural de  $\mu$  y el logaritmo natural del recíproco del tiempo de respuesta, frente a la temperatura en Kelvin, es posible estimar la energía de activación de las dos reacciones por las pendientes de las rectas obtenidas.

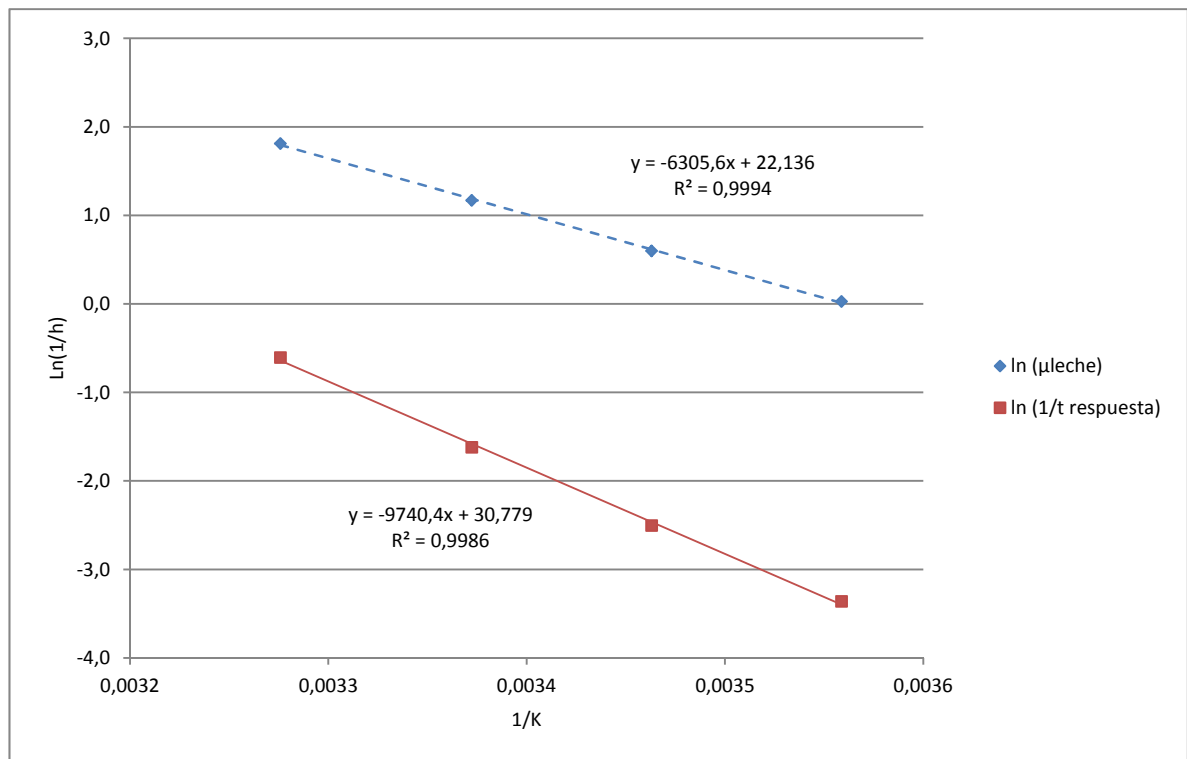
Para estimar el tiempo final del indicador se consideró un  $\Delta E$  de 8.0, valor en el que se observó un cambio evidente, claro y permanente en el indicador. Valores superiores en  $\Delta E$  se asociaron a cambios en la turbidez del medio que no afectan significativamente la lectura del usuario. Los demás parámetros ( $\mu$  y lag para el crecimiento del microorganismo,  $k_{max}$  y PS para el cambio de pH) para realizar el análisis se estimaron a partir de los modelos propuestos. La Gráfica 15, muestra los resultados de las regresiones lineales para los dos conjuntos de datos. El comportamiento del indicador es lineal con un  $R^2=0.99$  y una pendiente de  $-9740.4 \text{ K}^{-1}$ , el comportamiento de la leche corresponde a una línea recta, con un  $R^2=0.99$  y una pendiente de  $-6305.6 \text{ K}^{-1}$ .

A partir del modelo de Arrhenius, las energías de activación ( $E_A$ ) para el deterioro de la leche y para el prototipo son de  $-52.4 \text{ kJ/mol}$  ( $-12.52 \text{ kcal/mol}$ ) y  $-80.98 \text{ kJ/mol}$  ( $-19.34 \text{ kcal/mol}$ ) respectivamente. Duyvesteyna, Shimonib, y Labuza (2001) reportaron resultados similares estudiando la vida útil de la leche desde el punto de vista sensorial y el recuento de bacterias



aerobias. En el estudio determinaron que la  $E_A$  de la pérdida de calidad corresponde a 20.2 kcal/mol y la  $E_A$  para la duración de la fase lag para bacterias aerobias fue de 14 kcal/mol.

Estos valores son consistentes con  $E_A$  reportadas por Fu, Taoukis, y Labuza (1992) para diferentes reacciones asociadas a pérdidas de calidad e inocuidad. El comportamiento ideal en un TTI implica que las  $E_A$  de la reacción de deterioro y la reacción del prototipo sean “iguales”. Las  $E_A$  obtenidas muestran una diferencia cercana al 35%. El comportamiento observado en las pendientes de la Gráfica 15 indica un comportamiento seguro por defecto, donde el prototipo reacciona de manera anticipada al deterioro de la leche (Fu, Taoukis, & Labuza, 1992). Considerando lo anterior se decidió validar el prototipo.



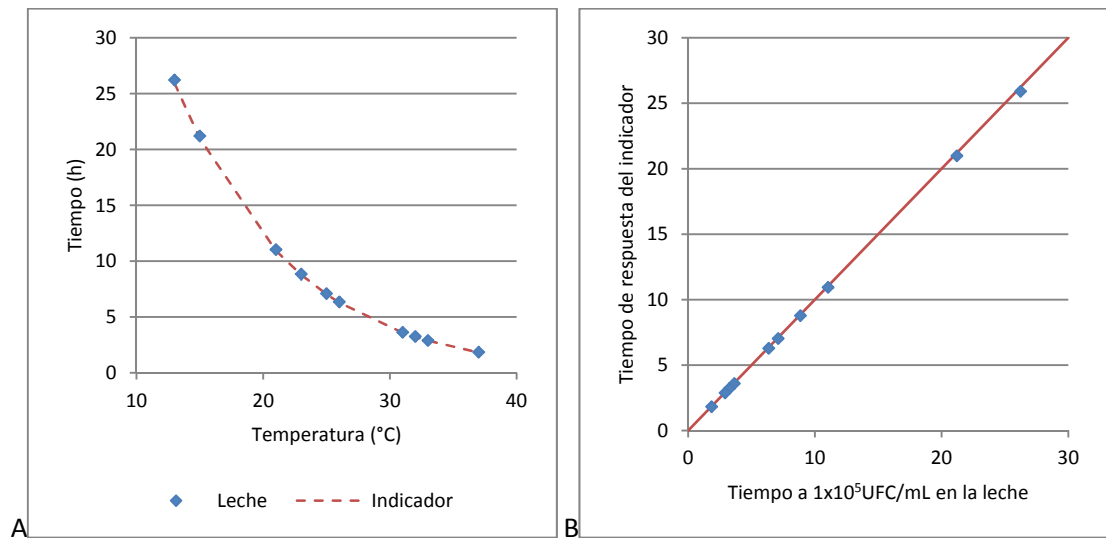
Gráfica 15: Tasa de crecimiento en función de la temperatura (modelo de Arrhenius). Las líneas corresponden a las regresiones lineales de los dos parámetros.

### 5.3 VALIDACIÓN DEL MODELO

Para validar el modelo se comparó el tiempo necesario para que la microflora en la leche alcance  $1 \times 10^5$  UFC/mL, que como se mencionó anteriormente corresponde a la dosis infectiva para varios microorganismos, y el tiempo necesario para lograr una respuesta en el indicador de ocho unidades  $\Delta E$  (valor establecido como punto de referencia en el indicador).

### 5.3.1 VALIDACIÓN DEL TTI EN CONDICIONES ISOTÉRMICAS

En condiciones isotérmicas se seleccionaron aleatoriamente 10 temperaturas diferentes dentro del rango del modelo y se compararon las respuestas anteriormente descritas; tiempo para alcanzar la dosis infectiva en la leche, y tiempo para alcanzar el cambio de color en el indicador.



Gráfica 16: Validación de la respuesta del TTI en condiciones isotérmicas

La validación mostró una tendencia del indicador a reaccionar en menor tiempo que la leche, es decir que el indicador tiende a ser seguro por defecto. La estimación de la diferencia entre las respuestas indica que en promedio la leche requiere un 1% más de tiempo para alcanzar el nivel crítico de microorganismos. Llevando lo anterior a las condiciones consideradas en la validación corresponde a diferencias de 0.3 y 0.03 horas (18 min y 1.8min) a 13°C y 37°C respectivamente. Desde el punto de vista práctico estas diferencias no tendrían efecto sobre los hábitos de consumo de los consumidores; es prácticamente imposible con los criterios establecidos que una persona pueda diferenciar el grado de deterioro de la leche en los intervalos de tiempo y condiciones mencionados, ni deben representar pérdidas económicas significativas a nivel de distribuidores pues se encuentran dentro de los rangos de espera y almacenamiento normales para estos productos.

Aplicando los conceptos propuesto por Ross (1996), sustituyendo el valor estimado por el tiempo de respuesta del indicador y el valor real por el tiempo para que la leche alcance el nivel crítico de microorganismos se obtienen un factor bias de 0.99 y un factor de exactitud de 1.01. Estos valores ratifican lo afirmado anteriormente donde la respuesta promedio del indicador es un 1% inferior al valor real observado en la leche, mostrando un comportamiento seguro por defecto.

### **5.3.2 VALIDACIÓN DEL TTI EN CONDICIONES DINÁMICAS DE TEMPERATURA**

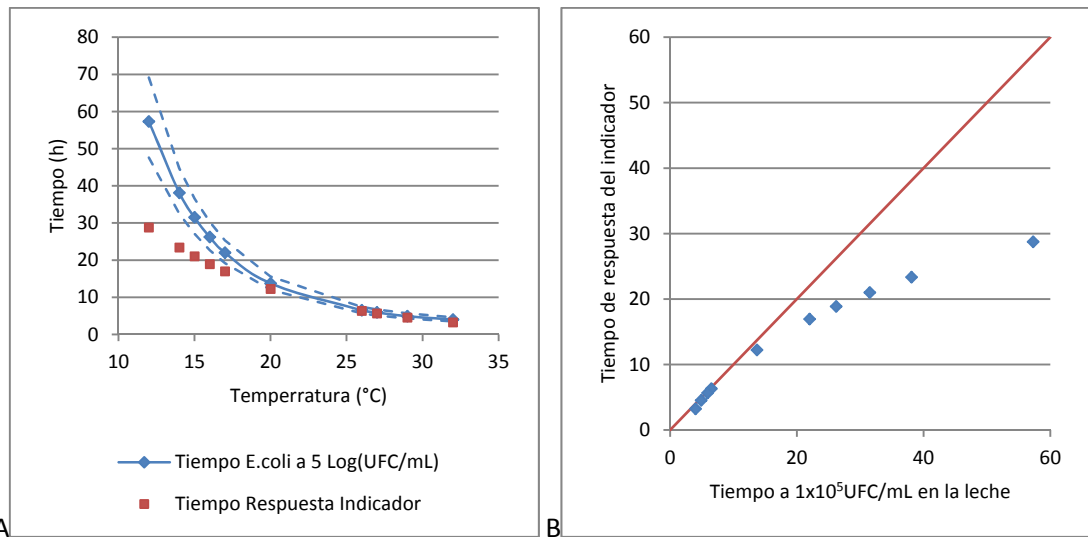
Los resultados de la validación en condiciones dinámicas de temperatura mostraron que el TTI reaccionó anticipadamente al fenómeno de deterioro. Los valores de factor bias (0.86 y 0.97) y factor de exactitud (1.17 y 1.06) para los perfiles de temperatura aleatorios y realistas respectivamente, indican una discrepancia conjunta cercana al 9% para los dos conjuntos de datos. Considerando la práctica industrial de empacar la leche pasteurizada a temperaturas de refrigeración y mantener esta condición hasta el expendio, las discrepancias entre la respuesta del TTI y el crecimiento de la microflora presente en la leche serían las correspondientes los perfiles realistas con una discrepancia cercana a 3%. Sin embargo al generar perfiles de temperatura con estas características; que inician con temperatura de refrigeración, se observó un mayor efecto al tener cambios muy bruscos de temperatura; correspondientes a dejar leche olvidada en un automóvil por una hora o sobre el mesón de la cocina por ejemplo, lo que induce la respuesta del TTI.

### **5.3.3 VALIDACIÓN DE LA RESPUESTA DEL TTI FRENTE AL CRECIMIENTO DE PATÓGENOS**

Para la validación de la respuesta respecto a microorganismos patógenos se consideraron inóculos iniciales de  $1 \times 10^3$  UFC/mL, valor mínimo aceptado por el software PMP, y se tomaron 10 temperaturas aleatoriamente para comparar las respuestas del TTI y los tiempos en los que el patógeno alcanza el nivel de riesgo.

#### **5.3.3.1 *Escherichia coli***

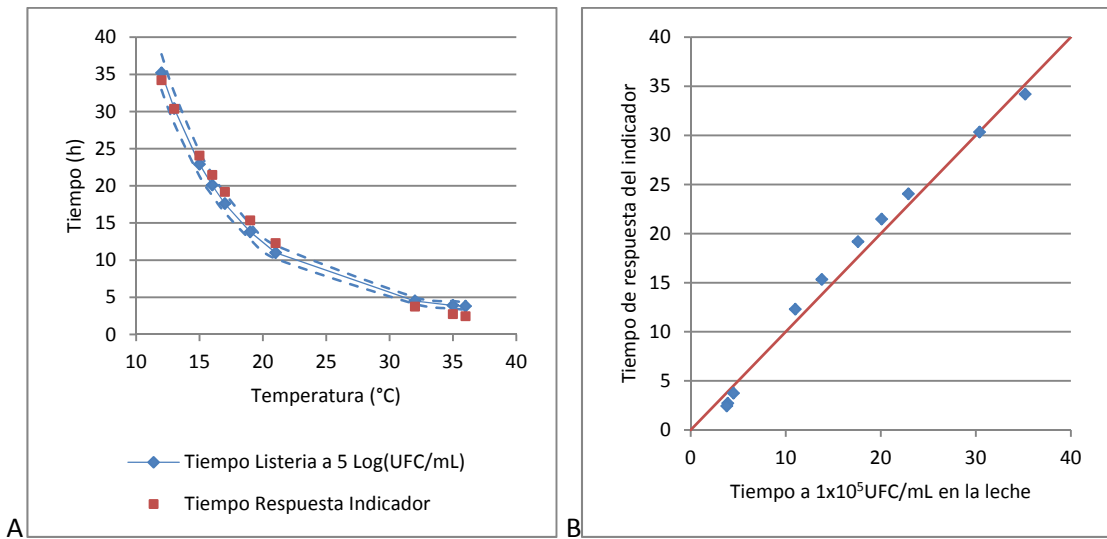
Los resultados de la validación mostraron la tendencia del TTI a ser seguro por defecto, es decir a reaccionar de manera anticipada al crecimiento del patógeno. Cuantitativamente a partir del factor bias (0.77) y del factor de exactitud (1.31), se estimó que la reacción del indicador ocurre en el 77% del tiempo que requiere el patógeno para alcanzar el nivel de riesgo. La Gráfica 17 muestra las respuestas del indicador y del crecimiento del patógeno al nivel de riesgo. Se evidenció que a bajas temperaturas se presentó la mayor discrepancia (50% a 12°C) a temperaturas cercanas a los 25°C que corresponden a temperaturas de abuso la discrepancia se reduce alcanzando valores menores al 5% entre los 25°C y 30°C.



Gráfica 17: Validación del TTI para *E. coli*. A, corresponde a los tiempos de respuesta respecto a la temperatura, las líneas punteadas corresponden al intervalo de confianza del 95% propuesto por el PMP para el crecimiento de *E. coli*. B corresponde a la relación entre los dos tiempos de respuesta, donde la línea sólida corresponde a un ajuste perfecto.

### 5.3.3.2 *Listeria monocytogenes*

La validación para *L.monocytogenes*, mostró una respuesta segura por defecto. Los valores del factor bias (0.94) y el factor de exactitud (1.15) permitieron establecer una exactitud del 85%. Como se muestra en la Gráfica 18 A, la tendencia segura por defecto prevalece en las temperaturas extremas del rango del modelo; por encima de 30°C y por debajo de 15°C, pero entre los 15°C y 30°C se observa una tendencia insegura con tiempos de reacción en el TTI un 12% mayores a los necesarios para que *L. monocytogenes* alcance el nivel crítico de 1x10<sup>5</sup> UFC/mL.



**Gráfica 18: Validación del TTI para *L. monocytogenes*.** A, corresponde a los tiempos de respuesta respecto a la temperatura, las líneas punteadas corresponden al intervalo de confianza del 95% propuesto por el PMP para el crecimiento de *L. monocytogenes*. B corresponde a la relación entre los dos tiempos de respuesta, donde la línea sólida corresponde a un ajuste perfecto.

## 6 CONCLUSIONES

Se seleccionaron el medio MRS como sustrato, el azul de bromotimol como indicador y la bacteria ácido láctica *L. plantarum* como componentes estructurales del TTI. La respuesta de los componentes estructurales del TTI muestra su potencial aplicación para determinar la calidad microbiológica de la leche refrigerada en el país.

El crecimiento de la microflora de la leche y del microorganismo indicador, se describieron satisfactoriamente utilizando la ecuación modificada de Gompertz, con  $ES \leq 0.88$  y  $R^2 \geq 0.69$  en el caso de la leche y  $ES \leq 0.47$  y  $R^2 \geq 0.97$  para el indicador. La validación de los modelos mostró un comportamiento seguro por defecto con una desviación del 17% en la leche y del 22% en el indicador.

Los parámetros de crecimiento de los microorganismos en la leche y de la bacteria ácido láctica del indicador se pueden modelar satisfactoriamente. En la leche  $\mu$  con una ecuación lineal y un  $R^2=0.92$  y la duración de la fase lag con una ecuación de orden dos con un  $R^2=0.75$ . En el indicador  $\mu$  con una ecuación cuadrática con un  $R^2=0.98$  y la duración de la fase lag con una ecuación exponencial con un  $R^2=0.77$ .

Se estableció un modelo que relaciona la cantidad de microorganismos en el indicador y el pH, con una ecuación que describe el comportamiento observado con un hombro en el pH inicial, una reducción log-lineal a partir de una población y una cola en el pH final.

Se estableció un modelo que relaciona el pH y el cambio de color en el indicador, por medio de una ecuación exponencial con un  $R^2=0.99$ .

La respuesta del indicador en condiciones isotermas y no isotermas es aceptable para un indicador de vida útil con una tendencia a estimar prematuramente el fin de la misma, con una desviación del 1% en condiciones isotermas y del 17% en el peor escenario en condiciones dinámicas

La respuesta del indicador frente a la presencia de patógenos es satisfactoria indicando el fin de la vida útil del producto antes que los patógenos alcancen un nivel crítico o la dosis infectiva.

## **7 RECOMENDACIONES:**

Estandarizar la materia prima de base para el desarrollo del TTI, con leche procesada y almacenada en las mismas condiciones para iniciar el seguimiento a los fenómenos de deterioro en condiciones más homogéneas en cuanto a la historia de manejo del producto.

Realizar una identificación y recuentos selectivos de la microflora presente en la leche con el fin de identificar el organismo u organismos específicos de deterioro que se están presentando en el producto a nivel local.

Validar el efecto del inóculo inicial en los parámetros del modelo tanto para la leche como para el indicador, la estimación realizada en este trabajo es teórica y puede ser distante del comportamiento real del microorganismo indicador, lo que puede distorsionar la respuesta del TTI.

Validar la respuesta a condiciones dinámicas de temperatura experimentalmente, las reacciones observadas a nivel de modelo pueden discrepar de las respuestas y reacciones que se observen particularmente a bajas temperaturas.

Una vez realizadas las validaciones propuestas es necesario el desarrollo de una evaluación económica que permita establecer el costo de producción del TTI para determinar su viabilidad financiera.

## 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277-294.
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1995). Mathematics of predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 199-218.
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (2004). Predictive Microbiology - Quantitative Microbial Ecology. *Culture*.
- Barbano, D. M., Ma, Y., & Santos, M. V. (2006). Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life. *Journal of Dairy Science Especial Supplement*, E15–E19.
- Bobelyn, E., Hertog, M. L., & Nicolaï, B. M. (2006). Applicability of an enzymatic time temperature integrator as a quality indicator for mushrooms in the distribution chain. *Postharvest Biology and Technology*, 104-114.
- Buchanan, R. I., & Phillips, J. G. (1990). Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*(53), 370-376.
- DANE. (2004). *Censo Producción de Leche Industrial Resultados 2004*. Bogotá D.C.
- Departamento Nacional de Planeación. (06 de 2007). Agenda interna para la productividad y la competitividad. *Documento Regional Bogotá-Cundinamarca*. Bogotá.
- Duyvesteyna, W. S., Shimonib, E., & Labuza, T. P. (2001). Determination of the End of Shelf-life for Milk using Weibull Hazard Method. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 143-148.
- Ellouze, M., Pichaud, M., Bonaiti, C., Coroller, L., Couvert, O., Thualut, D., & Vaillant, R. (2008). Modeling pH evolution and lactic acid production in the growth medium of lactic acid bacterium: Application to set a biological TTI. *International Journal of Food Microbiology*, 101-107.
- FEDEGAN. (20 de 05 de 2010). Producción Nacional de Leche. Bogotá D.C., Colombia.
- Fortin, C., & Goodwin, H. J. (2008). Valuation of Temp-Time's Fresh-Check® Indicator on Perishable Food Products in Belgium. *Southern Agricultural Economics Association Annual Meeting*, (págs. 1-20). Dallas, Texas.
- Fromm, H. I., & Boor, K. J. (2004). Characterization of Pasteurized Fluid Milk Shelf-life Attributes. *Journal of Food Science*, M207-M214.



- Fu, B., & Labuza, T. P. (1992). Considerations for the application of Time-Temperature integrators in food distribution. *Journal of Food Distribution Research*, 9-18.
- Fu, B., Taoukis, P. S., & Labuza, T. P. (1991). Predictive microbiology for monitoring spoilage of dairy products with Time-Temperature integrators. *Journal of Food Science*, 1209-1215.
- Fu, B., Taoukis, P. S., & Labuza, T. P. (1991). Predictive microbiology for monitoring spoilage of dairy products with Time-Temperature integrators. *Journal of Food Science*, 1209-1215.
- Fu, B., Taoukis, P. S., & Labuza, T. P. (1992). Theoretical design of a variable activation energy Time-Temperature integrator for prediction of food or drug shelf life. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 18(8), 829-850.
- Galagan, Y., & Su, W. F. (2008). Fadable ink for time–temperature control of food freshness: Novel new time–temperature indicator. *Food Research International*, 41, 653–657.
- Garrido, V., García-Jalón, I., & Vitas, A. I. (2010). Temperature distribution in Spanish domestic refrigerators and its effect on *Listeria monocytogenes* growth in sliced ready-to-eat ham. *Food Control*(21), 896-891.
- Geeraerd, A. H., Herremans, C., & Van Impe, J. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 59(3), 185-209.
- Goff, D. (07 de 11 de 2011). *Dairy Science and Technology*. Obtenido de Education Series: <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/home.html>
- Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., van Otterdijk, R., & Meybeck, A. (2011). *Global food losses and food waste*. Roma: Food and agriculture organization of the United Nations.
- Hamm, D. L., Hammond, E. G., & Hotchkiss, y. D. (1968). Effect of Temperature on Rate of Autoxidation of Milk Fat. *Journal of Dairy Science*.
- Huang, L. (2003). Dynamic computer simulation of *Clostridium perfringens* growth in cooked ground beef. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 217.227.
- Kantor, L. S., Lipton, K., Manchester, A., & Oliveira, V. (1997). Estimating and addressing America's food losses. *Food Review*, 2-12.
- Koseki, S. (2009). Microbial Responses Viewer (MRV): A new ComBase-derived database of microbial responses to food environments. *International Journal of Food Microbiology*, 31, 75-82.

- Koutsoumanis, K., Giannakourou, M. C., Taoukis, P. S., & Nychas, G. E. (2002). Application of shelf life decision system (SLDS) to marine cultured fish quality. *International Journal of Food Microbiology*, 375-382.
- Koutsoumanis, K., Giannakourou, M. C., Taoukis, P. S., & Nychas, G. E. (2002). Application of shelf life decision system (SLDS) to marine cultured fish quality. *International Journal of Food Microbiology*, 375-382.
- Koutsoumanis, K., Taoukis, P., & Nychas, G. (2005). Development of a Safety Monitoring and Assurance System for chilled food products. *International Journal of Food Microbiology*, 253-206.
- Kreyenschmidt, J., Christiansen, H., Hübner, A., Raab, V., & Petersen, B. (2010). A novel photochromic time-temperature indicator to support cold chain management. *International Journal of Food Science and Technology*, 208-215.
- Lasso, R. A. (2010). *Selección de los componentes estructurales de un integrador de tiempo y temperatura (TTI) para monitoreo de la calidad microbiológica de la leche cruda y pasteurizada*. Proyecto de grado de maestría, Bogotá D.C.
- Maschietti, M. (2010). Time-Temperature Indicators for Perishable Products. *Recent Patents on Engineering*, 4, 129-144.
- McMeekin, T. A., Brown, J., Krist, K., Miles, D., Neumeyer, K., Nichols, D. S., . . . Soontranon, S. (1997). Quantitative microbiology: a basis for food safety. *Emerging Infectious Diseases*, 3(4), 541-549.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR). (2010). *Boletín de Análisis por Producto: Leche*. Bogotá D.C.: Dirección de Política Sectorial - Grupo Análisis Sectorial.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia. (2005). *La agroindustria de lácteos y derivados en Colombia*. Documento de Trabajo, Bogotá D.C.
- Ministerio de la Protección Social. (28 de 02 de 2006). Decreto 616 de 2006. *Por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercialice, expendan, importe o exporte en el país*. Bogotá.
- Oliver, S. P., Boor, K. J., Murphy, S. C., & Murinda, S. E. (2009). Food Safety Hazards Associated with Consumption of Raw Milk. *Foodborne Pathogens and Disease*, 793-806.
- Olley, J. (1978). Current status of the theory of the application of temperature indicators, temperature integrators, and temperature function integrators to the food spoilage chain. *International Journal of Refrigeration*, 81-86.

- Peleg, M. (2006 ). *Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems*. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Pinon, A., Zwietering, M., Perrie, L., Membre, J.-M., Leporq, B., Mettler, E., . . . Vialette, M. (2004). Development and Validation of Experimental Protocols for Use of Cardinal Models for Prediction of Microorganism Growth in Food Products. *Applien and Environmental Microbiology*, 1081-1087.
- Poschet, F., Geeraerd, A. H., Scheerlinck, N., Nicolai, B. M., & Van Impe, J. F. (2003). Monte Carlo analysis as a tool to incorporate variation on experimental data in predictive microbiology. *Food microbiology*, 285-295.
- Ravuyan, P., Tang, J., Orellana, L., & Rasco, B. (2003). Physicochemical Properties of a Time-Temperature Indicator Based on Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -Amylase in Polyacrylamide Gel as Affected by Degree of Cross-linking Agent and Salt Content. *Journal of Food Science*, 2302-2308.
- Ray, B. (2005). Control by Heat. En B. Ray, *Fundamental Food Microbiology* (págs. 455-466). Boca Raton, Florida, USA: Taylor & Francis.
- Ross, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology*(81), 501-508.
- Rosso, I. (1995). Tesis doctoral, Université Claude Bernard, Lyon, France.
- Rosso, J., Lobry, J. R., Bajard, S., & Flandrois, J. P. (1995). Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 610-616.
- Salter, M., Ross, T., & McMeekin, T. (1998). Applicability of model for non-pathogenic *Escherichia coli* for predicting the growth of pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 357-364.
- Shellhammer, T., & Singh, R. (1991). Monitoring Chemical and Microbial Changes of Cottage Cheese using a Full-history Time-temperature Indicator. *Journal of Food Science*, 402-405.
- Sherlock, M., & Labuza, T. P. (1992). Consumer Perceptions of Consumer Time-Temperature indicators for Use on Refrigerated Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*, 3167-3176.
- Skandamis, P. N., & Nychas, G.-J. E. (2000). Development and Evaluation of a Model Predicting the Survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in Homemade Eggplant Salad at Various Temperatures, pHs, and Oregano Essential Oil Concentrations. *Applien and Environmental Microbiology*, 1646–1653.

- Taoukis, P. S., & Giannakourou, M. C. (2004). Temperature and food stability: analysis and control. En R. Steele, *Understanding and measuring the shelf-life of food* (págs. 42-68). Boca Raton: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
- Taoukis, P., & Labuza, T. (1989). Applicability of Time-Temperature Indicators as Shelf Life Monitors of Food Products. *Journal of Food Science*, 783-788.
- U.S. Food and Drug Administration. (2009). *Bad Bug Book*. Recuperado el 20 de 07 de 2011, de Bacillus cereus and other Bacillus spp.: <http://www.fda.gov/food/foodsafety/foodborneillness/foodborneillnessfoodbornepathogensnaturaltoxins/badbugbook/ucm070492.htm>
- Vaikousi, H., Biliaderis, C. G., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Development of a microbial Time/Temperature indicator prototype for monitoring the microbiological quality of chilled foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 3242-3250.
- van Gerwen, S. J., & Zwietering, M. H. (1998). Growth and inactivation models to be used in quantitative risk assessments. *Journal of Food Protection*, 61(11), 1541-1549.
- Walstra, P. (1999). Microbiology of Milk. En P. Walstra, *Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes* (págs. 174-188). New York, NY, USA: Marcel Dekker Incorporated.
- Wanihsuksombat, C., Hongtrakul, V., & Suppakul, P. (2010). Development and characterization of lactic acid-based time-temperature indicator for monitoring food product quality. *Journal of Food Engineering*, Doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.04.027.
- WHO Media centre. (Marzo de 2007). *Food safety and foodborne illness*. Recuperado el 01 de 05 de 2010, de World Health Organization: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/print.html>
- Zwietering, M. H., & den Besten, H. M. (2010). Modelling: one word for many activities and uses. *Food Microbiology*, doi: 10.1016/j.fm.2010.04.015.
- Zwietering, M. H., de Wit, J. C., & Notermans, S. (1996). Application of predictive microbiology to estimate the number of Bacillus cereus in pasteurised milk at the point of consumption. *International Journal of Food Microbiology*, 30, 55-70.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & van 'T Riet, K. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 1875-1881.

## ANEXOS

### Anexo 1: Crecimiento microbiano en la leche

LECHE A			LECHE B		
Temperatura	Tiempo	Log(UFC/mL)	Temperatura	Tiempo	Log(UFC/mL)
37	0	3.04	37	0	3.75
37	2	3.23	37	2	4.19
37	5	3.40	37	5	3.70
37	9	6.00	37	9	4.57
37	13	7.72	37	13	6.40
37	24	6.70	37	17	7.21
37	28	6.87	37	21	7.97
37	31	5.70	37	24	7.63
37	0	3.22	37	28	8.17
37	2	3.12	37	32	7.44
37	5	3.30	37	0	3.38
37	9	6.24	37	2	3.93
37	13	6.92	37	5	3.18
37	17	7.57	37	9	5.10
37	21	7.18	37	17	7.78
37	24	6.70	37	21	7.48
37	28	6.64	37	24	5.88
37	0	2.99	37	28	5.70
37	2	3.99	37	0	3.74
37	5	4.13	37	2	4.09
37	9	5.19	37	5	2.40
37	13	7.60	37	9	4.80
37	17	7.35	37	17	7.19
37	21	8.20	37	21	7.99
37	24	6.88	37	24	7.48
37	28	5.40	37	28	7.07
37	32	6.70	37	32	7.51
37	0	4.43	37	0	4.30
37	2.5	3.94	37	3	3.76
37	5	4.16	37	5	3.98
37	7.5	3.97	37	8	5.35
37	10	5.31	37	10	6.68
37	13	6.83	37	13	6.58
37	16	6.18	37	16	7.40
37	24	7.00	37	24	8.11
37	28	7.16	37	28	8.17
37	32	6.80	37	32	7.77
37	0	4.39	37	0	4.14
37	2.5	3.79	37	3	3.53
37	5	3.93	37	5	4.65
37	7.5	3.73	37	8	5.35
37	10	5.20	37	10	6.68
37	13	7.16	37	13	7.20
37	16	7.70	37	16	6.98
37	20	6.48	37	24	7.80

LECHE A			LECHE B		
Temperatura	Tiempo	Log(UFC/mL)	Temperatura	Tiempo	Log(UFC/mL)
37	24	7.81	37	28	8.24
37	28	6.91	37	32	7.88
37	32	6.83	37	0	4.16
37	0	4.20	37	3	3.73
37	2.5	3.46	37	5	4.35
37	5	4.14	37	8	5.30
37	7.5	4.22	37	10	6.54
37	10	5.02	37	13	7.23
37	13	6.23	37	16	6.54
37	16	7.72	37	20	7.74
37	20	6.99	37	24	7.70
37	24	6.44	37	28	8.02
37	28	6.60	37	32	7.81
37	32	6.41	37	0	3.26
37	0.0	2.78	37	3	4.61
37	2.5	3.14	37	5	4.81
37	5.0	4.72	37	8	5.17
37	7.5	4.88	37	10	6.81
37	10.0	6.90	37	13	7.35
37	13.0	7.00	37	16	7.70
37	16.0	8.00	37	20	8.00
37	20.0	7.20	37	24	8.21
37	24.0	6.90	37	28	8.68
37	32.0	6.44	37	32	8.44
37	0.0	2.98	37	0	3.43
37	2.5	3.17	37	3	3.44
37	5.0	3.60	37	5	4.76
37	7.5	4.70	37	8	5.05
37	13.0	7.10	37	10	6.16
37	16.0	7.74	37	13	7.92
37	20.0	6.00	37	16	7.67
37	24.0	6.65	37	20	7.73
37	28.0	5.57	37	24	8.78
37	32.0	5.49	37	28	8.10
28	0.00	3.46	37	32	8.48
28	2.5	3.12	28	0	3.18
28	5	3.52	28	3	3.71
28	7.5	4.74	28	5	4.11
28	10	5.73	28	8	4.59
28	13	7.33	28	10	5.59
28	16	7.72	28	13	6.17
28	20	8.68	28	16	7.10
28	24	9.19	28	20	7.23
28	28	9.22	28	24	9.19
28	32	8.77	28	28	9.22
28	0	3.10	28	32	8.77
28	2.5	2.99	28	0	2.94
28	5	4.08	28	3	3.31
28	7.5	4.63	28	5	3.59
28	10	5.72	28	8	4.81
28	13	7.37	28	10	5.52
28	16	8.37	28	13	5.91

LECHE A			LECHE B		
Temperatura	Tiempo	Log(UFC/mL)	Temperatura	Tiempo	Log(UFC/mL)
28	20	9.05	28	16	6.35
28	24	9.14	28	20	7.14
28	28	9.25	28	24	7.72
28	32	8.76	28	28	7.57
28	0	3.74	28	32	7.92
28	2.5	3.67	28	0	3.36
28	5	4.16	28	3	3.34
28	7.5	4.97	28	5	4.11
28	10	3.88	28	8	4.45
28	13	6.01	28	10	3.70
28	16	6.70	28	13	5.30
28	20	6.55	28	16	7.31
28	24	6.70	28	20	7.13
28	28	7.60	28	24	8.01
28	32	6.65	28	28	7.57
28	0	4.84	28	32	7.94
28	2.5	3.34	28	0	3.97
28	5	4.07	28	3	4.01
28	7.5	4.07	28	5	3.21
28	10	3.99	28	8	4.12
28	13	6.06	28	10	4.67
28	16	6.48	28	13	5.41
28	20	7.48	28	16	6.91
28	24	7.00	28	20	7.89
28	28	7.27	28	24	7.30
28	32	6.88	28	28	7.62
28	0	4.60	28	32	7.82
28	2.5	5.21	28	0	3.72
28	5	6.05	28	3	3.47
28	10	7.97	28	5	3.90
28	13	8.80	28	8	3.80
28	16	8.99	28	10	4.64
28	20	9.07	28	13	5.99
28	24	9.10	28	16	7.82
28	28	8.78	28	20	7.03
28	32	8.61	28	24	7.35
28	0	5.24	28	28	6.84
28	2.5	4.93	28	0	3.65
28	5	5.80	28	3	3.84
28	7.5	6.62	28	5	3.86
28	10	7.76	28	8	3.81
28	13	8.83	28	10	4.22
28	16	9.20	28	13	5.87
28	20	8.95	28	16	6.26
28	24	9.04	28	20	7.01
28	28	8.60	28	24	8.70
28	32	8.60	28	28	8.50
20	0	3.92	20	0	3.64
20	5	3.97	20	5	3.98
20	10	4.00	20	10	5.16
20	15	4.70	20	15	4.40
20	25	6.60	20	20	6.26

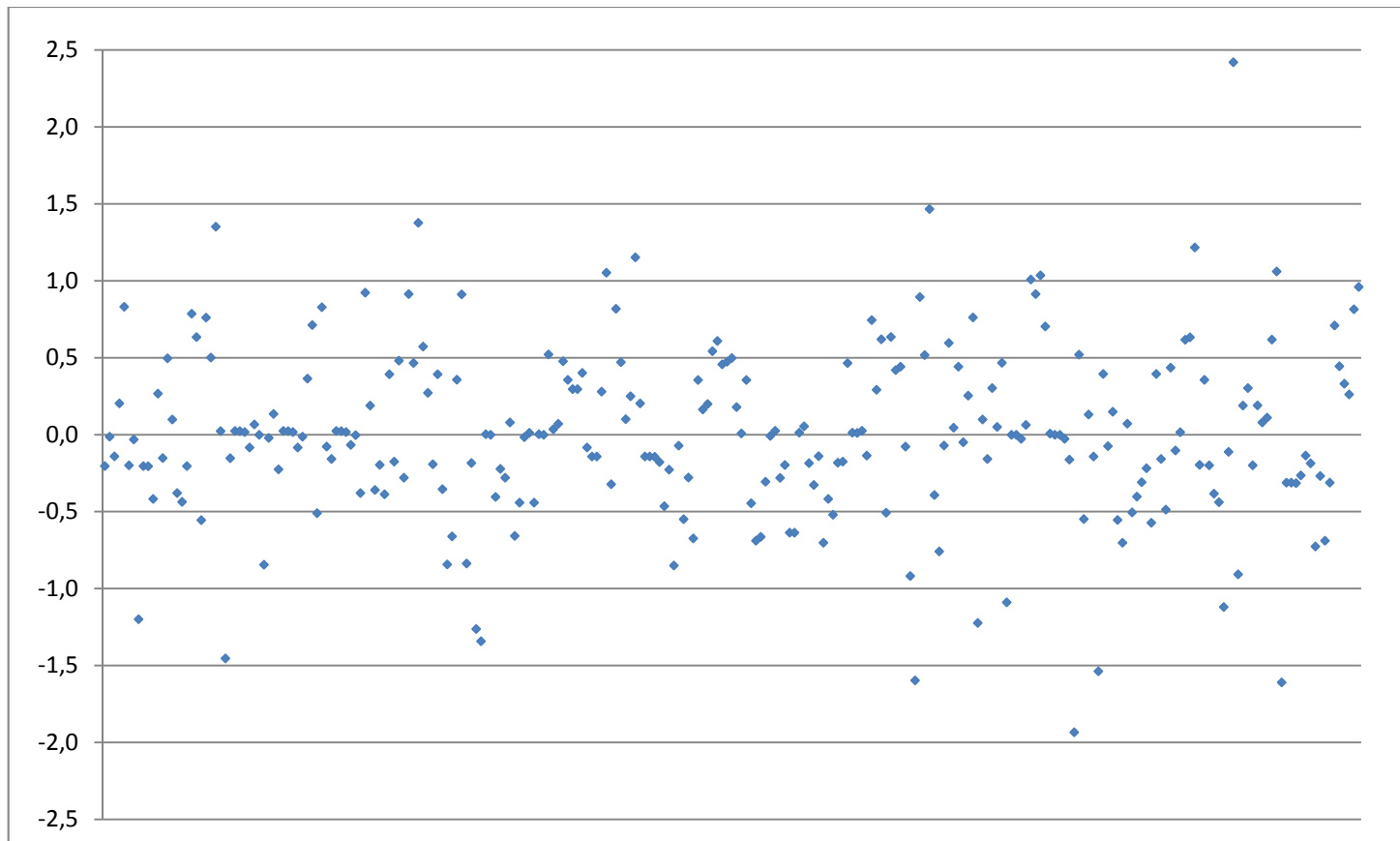
LECHE A			LECHE B		
Temperatura	Tiempo	Log(UFC/mL)	Temperatura	Tiempo	Log(UFC/mL)
20	30	6.79	20	25	6.38
20	35	7.48	20	30	6.05
20	40	7.48	20	35	6.89
20	46	7.83	20	40	6.54
20	50	7.84	20	46	6.75
20	56	8.48	20	50	7.51
20	0	3.59	20	56	6.75
20	5	3.51	20	0	3.75
20	10	3.88	20	5	4.44
20	15	4.56	20	10	5.89
20	20	6.30	20	25	6.62
20	25	6.70	20	30	6.57
20	30	7.78	20	35	7.02
20	35	7.06	20	40	6.70
20	50	8.31	20	46	7.10
20	56	8.10	20	50	7.30
20	0	3.40	20	56	7.22
20	5	3.56	20	0	2.89
20	10	3.36	20	5	3.51
20	15	3.30	20	10	3.70
20	20	6.55	20	15	4.48
20	25	6.78	20	20	6.40
20	30	8.13	20	25	6.23
20	35	6.41	20	30	7.57
20	40	6.08	20	35	7.03
20	45	6.77	20	40	7.09
20	50	7.44	20	45	7.02
20	55	6.89	20	50	7.01
20	0	3.44	20	55	6.18
20	5	3.63	20	0	3.44
20	10	4.61	20	5	3.54
20	15	5.80	20	10	3.48
20	20	4.48	20	15	6.24
20	25	6.40	20	20	5.90
20	30	6.54	20	25	6.60
20	35	7.15	20	30	7.46
20	40	6.93	20	35	6.57
20	50	7.35	20	40	6.64
20	55	5.80	20	50	6.64
20	0	3.93	20	55	6.85
20	5	3.53	20	0	3.35
20	10	3.77	20	5	4.04
20	15	4.43	20	10	3.40
20	20	6.11	20	15	4.03
20	30	7.46	20	25	7.70
20	40	8.00	20	30	7.36
20	50	7.67	20	35	6.68
20	55	6.98	20	40	7.36
20	0	4.16	20	45	7.65
20	5	3.73	20	50	7.24
20	10	3.65	20	55	6.22
20	20	5.18	20	0	3.35



LECHE A			LECHE B		
Temperatura	Tiempo	Log(UFC/mL)	Temperatura	Tiempo	Log(UFC/mL)
20	25	3.70	20	5	3.75
20	30	7.30	20	10	3.54
20	35	6.59	20	15	4.72
20	40	7.33	20	20	5.65
20	50	7.06	20	25	5.04
20	55	5.67	20	30	5.95
12	0	2.70	20	35	7.01
12	8	2.78	20	40	6.50
12	16	3.18	20	50	7.35
12	24	4.78	12	0	2.73
12	32	3.49	12	8	2.81
12	40	3.83	12	16	3.59
12	48	6.70	12	24	3.44
12	56	6.70	12	32	3.84
12	64	4.70	12	40	5.15
12	72	6.00	12	48	5.10
12	80	4.70	12	56	5.65
12	0	3.17	12	64	6.06
12	8	2.51	12	72	6.30
12	24	3.18	12	80	6.00
12	32	3.18	12	0	2.48
12	40	4.65	12	8	2.30
12	72	5.70	12	16	2.70
12	0	2.75	12	24	4.17
12	6	2.80	12	32	4.18
12	22	2.84	12	40	4.85
12	30	3.02	12	48	5.97
12	48	3.77	12	56	6.44
12	72	3.88	12	64	7.33
12	96	6.00	12	72	6.07
12	118	7.93	12	80	6.67
12	168	7.30	12	0	2.44
12	0	2.86	12	6	2.35
12	6	2.54	12	22	2.88
12	22	3.03	12	30	2.40
12	30	3.92	12	48	4.00
12	48	4.30	12	72	7.27
12	72	5.21	12	96	4.68
12	96	5.57	12	118	6.45
12	118	6.35	12	168	8.10
12	168	7.44	12	0	1.70
12	0	2.77	12	6	2.27
12	8	2.81	12	22	2.65
12	24	2.92	12	30	2.93
12	32	4.40	12	48	3.99
12	48	4.01	12	118	6.58
12	72	5.68	12	168	5.44
12	94	5.88	12	0	3.00
12	144	7.10	12	8	2.40
12	168	7.20	12	24	2.60
12	0	2.70	12	32	3.07
12	8	2.57	12	48	3.60

LECHE A			LECHE B		
Temperatura	Tiempo	Log(UFC/mL)	Temperatura	Tiempo	Log(UFC/mL)
12	24	3.18	12	72	4.98
12	32	2.81	12	94	5.76
12	48	3.99	12	144	7.23
12	72	4.94	12	168	6.81
12	144	6.87	12	0	2.00
12	168	7.00	12	8	3.02
			12	24	2.76
			12	32	2.67
			12	48	3.00
			12	94	6.30
			12	144	7.46

**Anexo 2: Gráfica de residuales del ajuste del modelo de Gompertz a los datos de crecimiento microbiano en leche**



### Anexo 3: Cambio de pH en la leche

LECHE A			LECHE B		
Temperatura	Tiempo	Log(UFC/mL)	Temperatura	Tiempo	Log(UFC/mL)
37	0	6.65	37	0	6.72
37	2	6.65	37	2	6.72
37	5	6.52	37	5	6.66
37	9	6.63	37	9	6.71
37	13	6.41	37	13	6.69
37	17	5.85	37	17	6.22
37	21	4.85	37	21	6.45
37	24	4.63	37	24	5.80
37	28	4.49	37	28	5.01
37	31	4.46	37	32	5.05
37	0	6.82	37	0	6.85
37	2.5	6.79	37	2.5	6.81
37	5	6.74	37	5	6.77
37	7.5	6.72	37	7.5	6.72
37	10	6.69	37	10	6.71
37	13	5.91	37	13	6.58
37	16	5.31	37	16	6.48
37	20	4.89	37	20	6.21
37	24	4.87	37	24	5.80
37	28	4.60	37	28	5.35
37	32	4.55	37	32	4.61
37	48	4.15	37	48	4.11
37	0	6.79	37	0	6.77
37	2.5	6.70	37	2.5	6.74
37	5	6.69	37	5	6.71
37	7.5	6.68	37	7.5	6.69
37	10	6.67	37	10	6.68
37	13	6.50	37	13	6.59
37	16	6.35	37	16	6.45
37	20	5.35	37	20	6.40
37	24	4.90	37	24	5.76
37	28	4.64	37	28	5.87
37	32	4.48	37	32	5.88
28	0	6.87	28	0	6.87
28	2.5	6.83	28	2.5	6.85
28	5	6.85	28	5	6.86
28	7.5	6.84	28	7.5	6.86
28	10	6.65	28	10	6.59
28	13	6.59	28	13	6.58
28	16	6.56	28	16	6.76
28	20	6.03	28	20	6.77
28	24	5.16	28	24	6.38
28	28	4.83	28	28	6.39
28	32	4.65	28	32	6.17
28	0	6.87	28	0	6.89
28	2.5	6.82	28	2.5	6.86
28	5	6.80	28	5	6.85

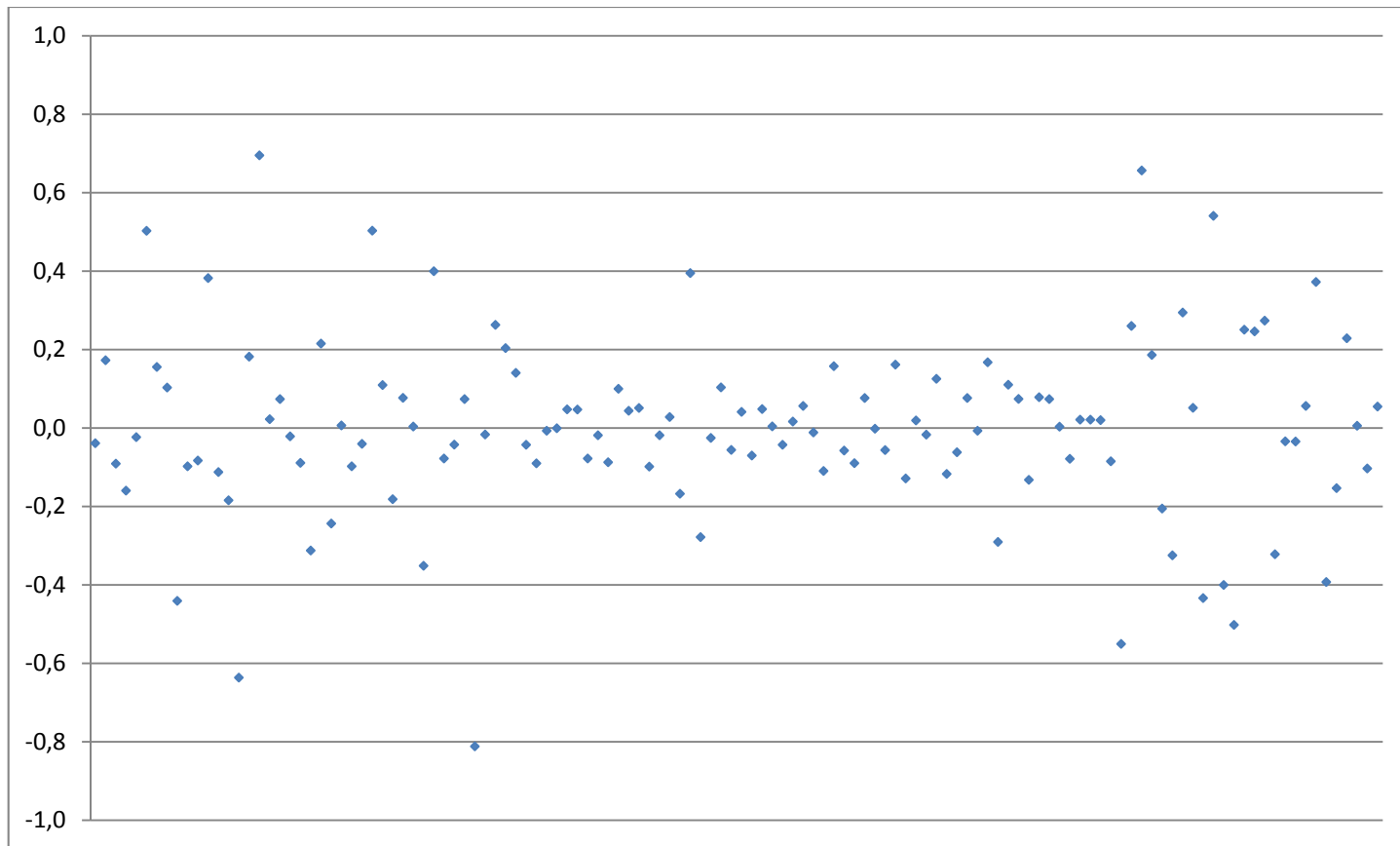
LECHE A			LECHE B		
Temperatura	Tiempo	Log(UFC/mL)	Temperatura	Tiempo	Log(UFC/mL)
28	7.5	6.80	28	7.5	6.83
28	10	6.81	28	10	6.84
28	13	6.83	28	13	6.86
28	16	6.64	28	16	6.65
28	20	6.55	28	20	6.64
28	24	6.56	28	24	6.62
28	28	5.99	28	28	6.37
28	32	5.46	28	32	6.09
28	0	6.77	28	0	6.78
28	2.5	6.72	28	2.5	6.75
28	5	6.70	28	5	6.73
28	7.5	6.63	28	7.5	6.73
28	10	6.39	28	10	6.72
28	13	5.32	28	13	6.70
28	16	4.57	28	16	6.65
28	20	4.48	28	20	6.60
28	24	4.45	28	24	6.21
28	28	4.39	28	28	6.04
28	32	4.39	28	32	5.81
20	0	6.78	20	0	6.80
20	5	6.66	20	5	6.62
20	10	6.81	20	10	6.82
20	15	6.72	20	15	6.66
20	20	6.71	20	20	6.71
20	25	6.74	20	25	6.62
20	30	6.27	20	30	6.32
20	35	5.92	20	35	6.09
20	40	5.58	20	40	5.97
20	46	5.13	20	46	5.88
20	50	5.10	20	50	5.97
20	56	4.81	20	56	5.83
20	0	6.76	20	0	6.81
20	5	6.68	20	5	6.70
20	10	6.40	20	10	6.63
20	15	6.67	20	15	6.76
20	20	6.35	20	20	6.59
20	25	6.39	20	25	6.65
20	30	6.40	20	30	6.47
20	35	6.34	20	35	6.41
20	40	6.61	20	40	6.42
20	45	6.62	20	45	6.47
20	50	6.54	20	50	6.36
20	55	6.51	20	55	6.32
20	0	6.77	20	0	6.82
20	5	6.70	20	5	6.67
20	10	6.54	20	10	6.70
20	15	6.72	20	15	6.77
20	20	6.48	20	20	6.65
20	25	6.56	20	25	6.65
20	30	6.44	20	30	6.52
20	35	6.47	20	35	6.38
20	40	6.37	20	40	6.32

LECHE A			LECHE B		
Temperatura	Tiempo	Log(UFC/mL)	Temperatura	Tiempo	Log(UFC/mL)
20	45	6.06	20	45	6.37
20	50	6.54	20	50	6.32
20	55	6.51	20	55	6.38
12	0	6.61	12	0	6.71
12	8	6.68	12	8	6.71
12	16	6.79	12	16	6.77
12	24	6.88	12	24	6.87
12	32	6.82	12	32	6.87
12	40	6.76	12	40	6.40
12	48	6.91	12	48	6.76
12	56	6.89	12	56	6.92
12	64	6.82	12	64	6.76
12	72	6.89	12	72	6.71
12	80	6.89	12	80	6.76
12	0	6.70	12	0	6.74
12	6	6.70	12	6	6.73
12	22	6.66	12	22	6.69
12	30	6.70	12	30	6.72
12	48	6.67	12	48	6.71
12	72	6.69	12	72	6.71
12	96	6.62	12	96	6.58
12	118	6.63	12	118	6.67
12	168	6.37	12	168	6.60
12	0	6.70	12	0	6.72
12	8	6.67	12	8	6.70
12	24	6.63	12	24	6.67
12	32	6.67	12	32	6.70
12	48	6.71	12	48	6.73
12	72	6.70	12	72	6.73
12	94	6.66	12	94	6.64
12	144	6.62	12	144	6.47
12	168	6.32	12	168	6.32

### Anexo 4: Crecimiento del microorganismo indicador

Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Log(UFC/mL)	Tiempo (h)	Log(UFC/mL)	Tiempo (h)	Log(UFC/mL)
37	0.0	3.08	0.0	2.58	0.0	2.80
37	2.5	3.63	2.5	3.42	2.5	3.76
37	5.0	4.88	5.0	4.68	5.0	5.42
37	7.5	6.32	7.5	5.56	7.5	6.72
37	10.0	7.89	10.0	7.65	10.0	8.06
37	13.0	9.42	13.0	9.31	13.0	9.51
37	16.0	9.21	16.0	9.02	16.0	9.28
37	20.0	9.17	20.0	9.12	20.0	9.00
37	24.0	8.62	24.0	9.03	24.0	9.26
37	28.0	8.96	28.0	8.96	28.0	9.19
37	32.0	8.98	32.0	8.74	32.0	8.83
28	0	3.27	0	3.21	0	3.27
28	2.5	3.50	2.5	3.52	2.5	3.36
28	5	4.25	5	4.30	5	3.87
28	7.5	5.08	7.5	5.03	7.5	5.22
28	10	4.90	10	5.64	10	5.34
28	13	6.55	13	6.57	13	6.53
28	16	7.66	16	7.35	16	7.58
28	20	8.59	20	8.54	20	8.50
28	24	9.18	24	9.05	24	9.16
28	28	9.22	28	9.20	28	9.18
28	32	9.22	32	9.08	32	9.31
20	0	2.99	0	2.83	0	2.76
20	8	3.27	8	3.33	8	3.30
20	16	4.57	16	4.78	16	4.12
20	24	5.85	24	5.72	24	5.79
20	40	8.09	40	8.13	40	8.13
20	44	8.38	44	8.47	44	8.32
20	48	8.88	48	8.83	48	8.77
20	52	8.77	52	8.70	52	8.88
20	57	8.79	57	8.80	57	8.86
20	74	8.97	74	8.96	74	8.80
12	0	3.00	0	2.89	0	2.49
12	8	2.65	8	2.72	8	2.27
12	24	2.53	24	2.37	24	2.59
12	48	2.94	48	4.59	48	3.44
12	72	3.29	72	4.38	72	3.67
12	95	4.97	95	4.97	95	4.87
12	144	7.22	144	7.21	144	7.25
12	168	7.66	168	7.93	168	7.90
12	192	8.18	192	8.69	192	8.37
12	216	8.97	216	8.82	216	8.76

**Anexo 5: Gráfica de residuales del ajuste del modelo de Gompertz a los datos de crecimiento del microorganismo indicador**

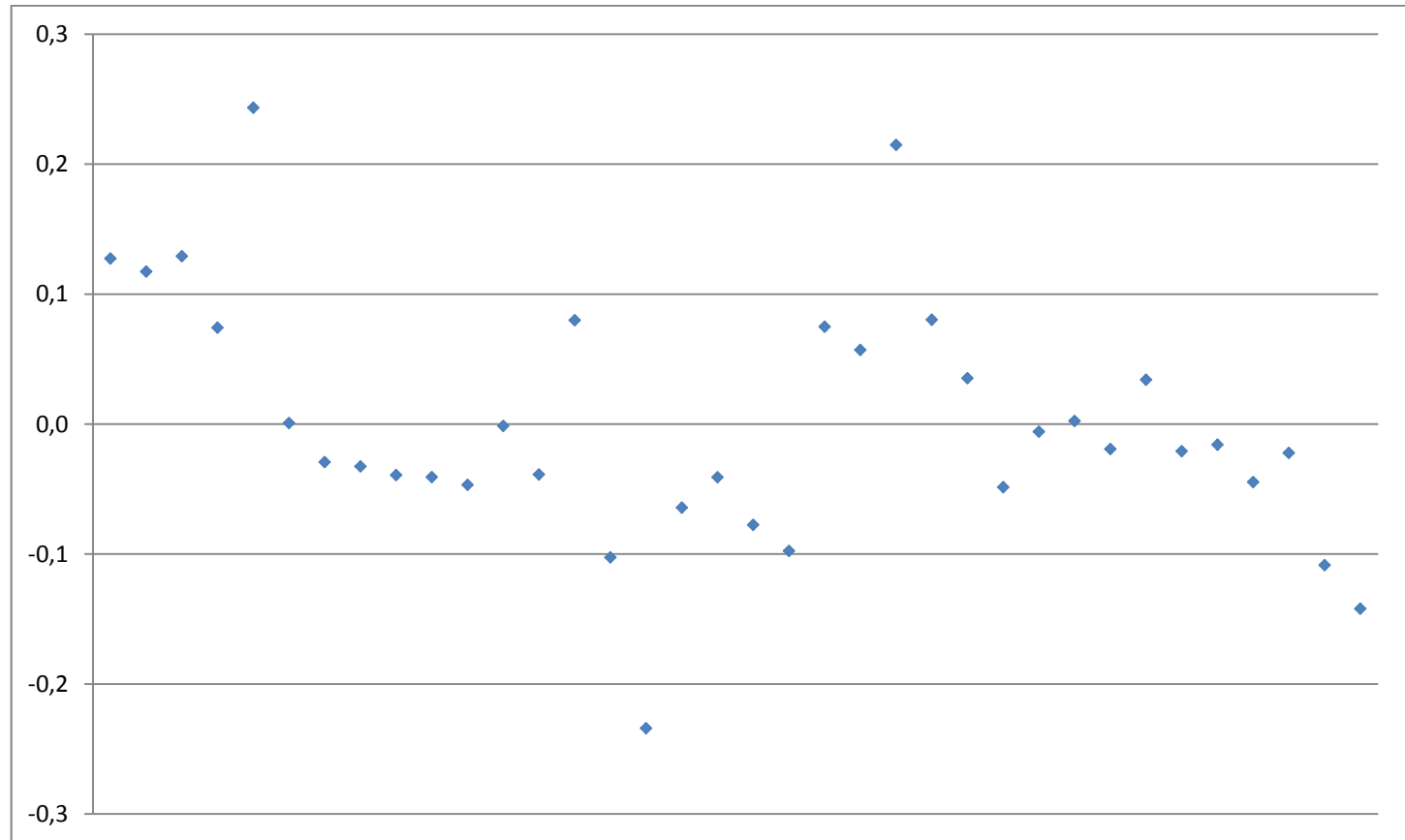




## Anexo 6: Cambio de pH en el medio indicador

Temperatura (°C)	Tiempo (h)	pH	Tiempo (h)	pH	Tiempo (h)	pH
37	0.0	6.54	0.0	6.53	0.0	6.58
37	2.5	6.50	2.5	6.56	2.5	6.56
37	5.0	6.51	5.0	6.57	5.0	6.58
37	7.5	6.50	7.5	6.56	7.5	6.43
37	10.0	6.37	10.0	6.47	10.0	6.14
37	13.0	4.97	13.0	5.21	13.0	4.76
37	16.0	4.44	16.0	4.50	16.0	4.35
37	20.0	4.16	20.0	4.17	20.0	4.12
37	24.0	4.09	24.0	4.06	24.0	4.05
37	28.0	4.01	28.0	4.01	28.0	4.00
37	32.0	3.95	32.0	3.95	32.0	3.93
28	0.0	6.48	0.0	6.43	0.0	6.43
28	2.5	6.40	2.5	6.37	2.5	6.41
28	5.0	6.39	5.0	6.39	5.0	6.39
28	7.5	6.39	7.5	6.38	7.5	6.39
28	10.0	6.39	10.0	6.36	10.0	6.39
28	13.0	6.36	13.0	6.38	13.0	6.37
28	16.0	6.28	16.0	6.28	16.0	6.30
28	20.0	5.33	20.0	5.27	20.0	5.34
28	24.0	4.58	24.0	4.54	24.0	4.58
28	28.0	4.30	28.0	4.26	28.0	4.29
28	32.0	4.13	32.0	4.17	32.0	4.13
20	0.0	6.37	0.0	6.34	0.0	6.37
20	8.0	6.35	8.0	6.35	8.0	6.45
20	16.0	6.33	16.0	6.36	16.0	6.35
20	24.0	6.35	24.0	6.33	24.0	6.29
20	32.0	6.22	32.0	6.20	32.0	6.17
20	40.0	5.12	40.0	5.14	40.0	5.19
20	44.0	4.80	44.0	4.75	44.0	4.68
20	48.0	4.29	48.0	4.30	48.0	4.31
20	52.0	4.18	52.0	4.19	52.0	4.21
20	57.0	4.08	57.0	4.11	57.0	4.10
20	74.0	3.89	74.0	3.87	74.0	3.87
12	0.0	6.42	0.0	6.45	0.0	6.38
12	8.0	6.39	8.0	6.45	8.0	6.44
12	24.0	6.38	24.0	6.41	24.0	6.42
12	48.0	6.41	48.0	6.51	48.0	6.45
12	72.0	6.36	72.0	6.40	72.0	6.45
12	95.0	6.43	95.0	6.38	95.0	6.41
12	144.0	6.30	144.0	6.37	144.0	6.30
12	168.0	6.16	168.0	6.04	168.0	6.07
12	192.0	5.53	192.0	5.10	192.0	5.53
12	216.0	4.66	216.0	4.71	216.0	4.87

**Anexo 7: Gráfica de residuales del ajuste del modelo para el cambio de pH a partir del crecimiento del microorganismo indicador**



## Anexo 8: Mediciones de color y cambio de color del indicador

Temperatura (°C)	Tiempo	Réplica	pH	L*	a*	b*	dL*	da*	db*	dE*
37	0	1	6.54	25.53	-2.04	-1.48	-0.28	-0.04	1.04	1.08
37	0	1	6.54	25.52	-2.06	-1.47	-0.28	-0.05	1.05	1.09
37	2.5	1	6.50	25.58	-2.08	-1.5	-0.23	-0.08	1.02	1.05
37	2.5	1	6.49	25.59	-2.07	-1.53	-0.22	-0.06	0.99	1.02
37	5	1	6.51	25.58	-2.06	-1.49	-0.23	-0.05	1.04	1.06
37	5	1	6.50	25.56	-2.05	-1.51	-0.24	-0.05	1.02	1.04
37	7.5	1	6.50	25.66	-2.1	-1.77	-0.14	-0.1	0.75	0.77
37	7.5	1	6.49	25.65	-2.05	-1.78	-0.15	-0.05	0.75	0.76
37	10	1	6.38	25.72	-1.84	-1.15	-0.08	0.17	1.37	1.38
37	10	1	6.36	25.72	-1.8	-1.21	-0.09	0.21	1.31	1.33
37	13	1	4.98	27.67	-1.3	2.19	1.87	0.71	4.72	5.12
37	13	1	4.95	27.68	-1.31	2.2	1.87	0.69	4.72	5.13
37	16	1	4.44	29.12	-0.38	4.49	3.32	1.62	7.01	7.92
37	16	1	4.43	29.13	-0.34	4.51	3.32	1.66	7.04	7.96
37	20	1	4.15	29.7	0.06	4.99	3.89	2.07	7.51	8.71
37	20	1	4.16	29.69	0.09	4.94	3.89	2.1	7.47	8.68
37	24	1	4.11	30.03	0.24	5.2	4.23	2.24	7.73	9.09
37	24	1	4.06	30.01	0.2	5.25	4.21	2.21	7.78	9.12
37	28	1	4.02	30.24	0.05	5.56	4.43	2.05	8.09	9.45
37	28	1	3.99	30.24	0.02	5.58	4.43	2.03	8.11	9.46
37	32	1	3.99	30.27	0	5.27	4.47	2	7.79	9.2
37	32	1	3.91	30.25	-0.02	5.29	4.45	1.98	7.82	9.21
37	0	2	6.54	25.6	-2.19	-1.41	-0.2	-0.19	1.12	1.15
37	0	2	6.51	25.61	-2.18	-1.38	-0.19	-0.17	1.14	1.17
37	2.5	2	6.56	25.75	-2.34	-2.04	-0.06	-0.34	0.48	0.59
37	2.5	2	6.56	25.75	-2.32	-2.06	-0.06	-0.31	0.46	0.56
37	5	2	6.56	25.88	-2.49	-2.09	0.08	-0.48	0.43	0.65
37	5	2	6.58	25.89	-2.49	-2.1	0.08	-0.48	0.43	0.65
37	7.5	2	6.56	25.72	-2.22	-1.75	-0.09	-0.21	0.77	0.8
37	7.5	2	6.56	25.73	-2.19	-1.73	-0.08	-0.19	0.79	0.82
37	10	2	6.42	25.79	-2.11	-1.56	-0.02	-0.11	0.96	0.97
37	10	2	6.52	25.78	-2.09	-1.6	-0.02	-0.09	0.92	0.93
37	13	2	5.19	26.72	-1.19	1.06	0.92	0.81	3.58	3.79
37	13	2	5.22	26.73	-1.21	1.07	0.93	0.8	3.6	3.8
37	16	2	4.51	28.65	-0.21	3.91	2.85	1.8	6.43	7.26
37	16	2	4.49	28.67	-0.19	3.89	2.87	1.81	6.42	7.26
37	20	2	4.18	29.72	0.03	5.03	3.92	2.03	7.56	8.75
37	20	2	4.16	29.72	0.04	5	3.92	2.04	7.52	8.72
37	24	2	4.05	30.21	-0.05	5.51	4.41	1.95	8.03	9.37
37	24	2	4.06	30.18	0.02	5.5	4.38	2.02	8.02	9.36
37	28	2	3.99	30.14	0.19	5.49	4.34	2.2	8.01	9.37
37	28	2	4.02	30.12	0.21	5.46	4.32	2.22	7.98	9.34
37	32	2	3.95	30.56	-0.53	5.5	4.75	1.47	8.02	9.44
37	32	2	3.94	30.57	-0.52	5.45	4.76	1.49	7.98	9.41
37	0	3	6.60	25.44	-1.92	-1.77	-0.36	0.09	0.76	0.84
37	0	3	6.56	25.45	-1.92	-1.73	-0.35	0.09	0.79	0.87
37	2.5	3	6.57	25.91	-2.38	-2.11	0.1	-0.38	0.42	0.57
37	2.5	3	6.55	25.91	-2.41	-2.08	0.11	-0.41	0.44	0.61
37	5	3	6.57	25.78	-2.27	-2.17	-0.02	-0.27	0.35	0.44
37	5	3	6.58	25.77	-2.31	-2.15	-0.03	-0.3	0.37	0.48
37	7.5	3	6.42	25.45	-1.68	-1.22	-0.35	0.32	1.3	1.39
37	7.5	3	6.43	25.41	-1.67	-1.23	-0.39	0.33	1.29	1.39
37	10	3	6.12	25.58	-1.46	-0.9	-0.22	0.55	1.62	1.73
37	10	3	6.15	25.59	-1.52	-0.87	-0.21	0.48	1.65	1.73
37	13	3	4.76	28.24	-0.66	3.08	2.44	1.35	5.61	6.26

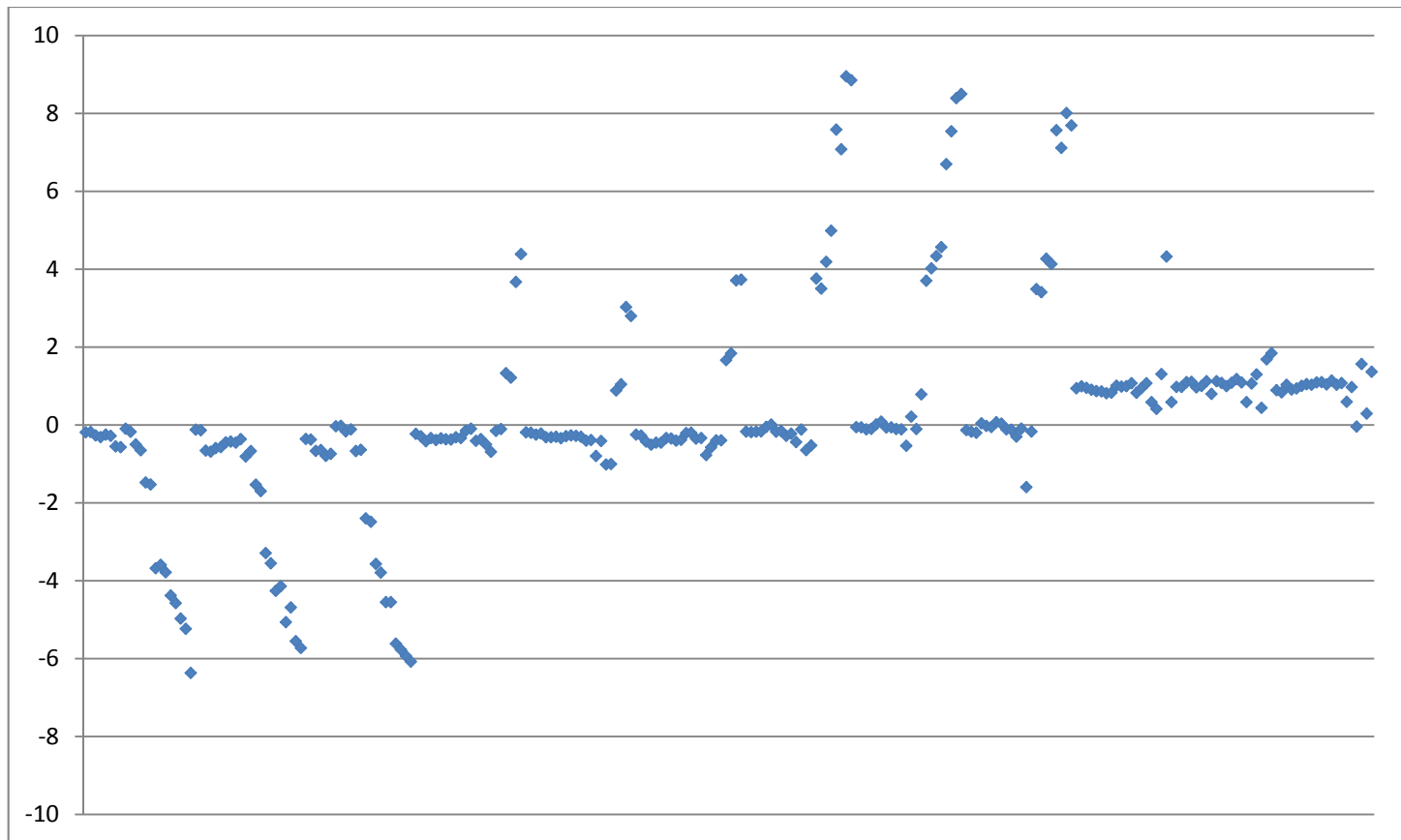
Temperatura (°C)	Tiempo	Réplica	pH	L*	a*	b*	dL*	da*	db*	dE*
37	13	3	4.76	28.26	-0.68	3.11	2.46	1.32	5.64	6.29
37	16	3	4.35	29.04	0.03	4.32	3.23	2.04	6.85	7.84
37	16	3	4.34	29.03	0.02	4.34	3.23	2.03	6.87	7.85
37	20	3	4.13	29.96	0.04	5.26	4.16	2.05	7.78	9.06
37	20	3	4.11	29.98	0.03	5.28	4.18	2.04	7.8	9.08
37	24	3	4.05	29.91	0.52	5.17	4.11	2.53	7.69	9.08
37	24	3	4.05	29.91	0.56	5.16	4.11	2.56	7.69	9.08
37	28	3	4.00	29.5	0.49	4.92	3.7	2.49	7.44	8.68
37	28	3	3.99	29.49	0.5	4.9	3.69	2.5	7.42	8.66
37	32	3	3.93	30.2	0.35	5.39	4.4	2.35	7.91	9.35
37	32	3	3.92	30.21	0.34	5.38	4.41	2.34	7.91	9.35
28	0	1	6.50	25.55	-2.29	-1.51	-0.25	-0.29	1.02	1.09
28	0	1	6.46	25.56	-2.29	-1.51	-0.24	-0.28	1.01	1.08
28	2.5	1	6.38	25.53	-2.22	-1.52	-0.27	-0.22	1	1.06
28	2.5	1	6.41	25.52	-2.21	-1.48	-0.28	-0.21	1.04	1.1
28	5	1	6.38	25.77	-2.3	-1.48	-0.04	-0.3	1.05	1.09
28	5	1	6.39	25.77	-2.36	-1.46	-0.04	-0.35	1.06	1.12
28	7.5	1	6.38	25.92	-2.23	-1.44	0.12	-0.23	1.08	1.11
28	7.5	1	6.39	25.92	-2.2	-1.46	0.11	-0.2	1.06	1.09
28	10	1	6.39	25.99	-2.27	-1.42	0.19	-0.26	1.1	1.15
28	10	1	6.39	25.98	-2.26	-1.44	0.18	-0.25	1.08	1.13
28	13	1	6.34	25.75	-2.16	-1.14	-0.05	-0.15	1.38	1.39
28	13	1	6.38	25.75	-2.19	-1.16	-0.06	-0.18	1.36	1.38
28	16	1	6.28	25.74	-2.18	-1.32	-0.06	-0.18	1.2	1.22
28	16	1	6.27	25.74	-2.21	-1.26	-0.06	-0.2	1.26	1.28
28	20	1	5.36	26.7	-1.9	0.77	0.89	0.1	3.29	3.41
28	20	1	5.3	26.7	-1.88	0.8	0.9	0.12	3.33	3.45
28	24	1	4.58	29.61	-1	4.52	3.81	1.01	7.05	8.07
28	24	1	4.58	29.62	-1.02	4.57	3.82	0.99	7.1	8.12
28	28	1	4.3	32.68	-1.56	7.38	6.88	0.45	9.91	12.07
28	28	1	4.29	32.67	-1.57	7.37	6.87	0.43	9.9	12.06
28	32	1	4.1	35.91	-1.51	10.72	10.11	0.5	13.24	16.67
28	32	1	4.16	35.92	-1.49	10.71	10.11	0.52	13.23	16.66
28	0	2	6.43	25.65	-2.4	-1.38	-0.15	-0.4	1.14	1.22
28	0	2	6.43	25.63	-2.39	-1.39	-0.17	-0.38	1.14	1.21
28	2.5	2	6.36	25.52	-2.28	-1.33	-0.28	-0.27	1.2	1.26
28	2.5	2	6.38	25.51	-2.28	-1.33	-0.29	-0.28	1.2	1.26
28	5	2	6.39	25.71	-2.18	-1.39	-0.09	-0.18	1.13	1.15
28	5	2	6.39	25.7	-2.23	-1.4	-0.1	-0.22	1.12	1.15
28	7.5	2	6.37	25.9	-2.23	-1.35	0.09	-0.22	1.17	1.19
28	7.5	2	6.38	25.87	-2.25	-1.42	0.07	-0.25	1.11	1.14
28	10	2	6.36	25.74	-1.94	-1.31	-0.06	0.07	1.21	1.22
28	10	2	6.36	25.76	-1.91	-1.29	-0.04	0.1	1.23	1.24
28	13	2	6.38	25.74	-2.2	-1.34	-0.06	-0.2	1.18	1.2
28	13	2	6.37	25.73	-2.22	-1.36	-0.07	-0.21	1.17	1.19
28	16	2	6.27	25.7	-2.02	-1.29	-0.1	-0.01	1.23	1.24
28	16	2	6.28	25.7	-1.98	-1.29	-0.1	0.02	1.24	1.24
28	20	2	5.22	26.81	-1.63	0.98	1	0.38	3.51	3.67
28	20	2	5.32	26.78	-1.62	0.97	0.98	0.38	3.5	3.65
28	24	2	4.54	29.1	-0.25	4.01	3.3	1.75	6.54	7.53
28	24	2	4.54	29.09	-0.22	4.02	3.29	1.79	6.55	7.54
28	28	2	4.25	32.34	-0.4	7.59	6.54	1.6	10.11	12.15
28	28	2	4.26	32.34	-0.39	7.65	6.54	1.61	10.18	12.2
28	32	2	4.18	34.79	-1.82	9.58	8.99	0.18	12.1	15.07
28	32	2	4.16	34.78	-1.84	9.58	8.98	0.17	12.1	15.07
28	0	3	6.43	25.58	-2.33	-1.43	-0.22	-0.32	1.09	1.16
28	0	3	6.42	25.58	-2.29	-1.43	-0.22	-0.28	1.09	1.15
28	2.5	3	6.41	25.58	-2.22	-1.56	-0.22	-0.22	0.97	1.01

Temperatura (°C)	Tiempo	Réplica	pH	L*	a*	b*	dL*	da*	db*	dE*
28	2.5	3	6.41	25.58	-2.19	-1.63	-0.22	-0.18	0.89	0.93
28	5	3	6.39	25.72	-2.23	-1.54	-0.08	-0.22	0.98	1.01
28	5	3	6.39	25.71	-2.22	-1.55	-0.09	-0.22	0.98	1.01
28	7.5	3	6.39	25.94	-2.35	-1.45	0.14	-0.35	1.07	1.13
28	7.5	3	6.38	25.94	-2.32	-1.45	0.14	-0.32	1.08	1.13
28	10	3	6.39	25.87	-2.14	-1.48	0.07	-0.14	1.05	1.06
28	10	3	6.39	25.88	-2.19	-1.46	0.08	-0.18	1.06	1.08
28	13	3	6.36	25.81	-2.21	-1.24	0	-0.2	1.28	1.3
28	13	3	6.38	25.79	-2.22	-1.26	-0.01	-0.22	1.26	1.28
28	16	3	6.29	25.76	-2.29	-1.3	-0.04	-0.29	1.23	1.26
28	16	3	6.3	25.75	-2.28	-1.3	-0.05	-0.28	1.23	1.26
28	20	3	5.31	26.58	-1.75	0.71	0.78	0.25	3.23	3.33
28	20	3	5.37	26.56	-1.71	0.68	0.76	0.3	3.2	3.3
28	24	3	4.58	29.71	-1.24	4.22	3.9	0.76	6.74	7.83
28	24	3	4.58	29.7	-1.29	4.23	3.9	0.72	6.75	7.83
28	28	3	4.28	32.99	-1.72	7.83	7.19	0.28	10.36	12.61
28	28	3	4.3	32.98	-1.75	7.8	7.18	0.25	10.33	12.58
28	32	3	4.13	35.72	-2.16	10.46	9.92	-0.16	12.98	16.34
28	32	3	4.13	35.72	-2.15	10.49	9.91	-0.15	13.01	16.36
20	0	1	6.36	25.6	-2.31	-1.23	-0.21	-0.3	1.29	1.34
20	0	1	6.37	25.6	-2.32	-1.27	-0.2	-0.32	1.25	1.31
20	8	1	6.35	25.58	-2.16	-1.2	-0.22	-0.15	1.32	1.35
20	8	1	6.34	25.57	-2.2	-1.18	-0.23	-0.19	1.34	1.37
20	16	1	6.33	25.47	-2.17	-1.07	-0.34	-0.17	1.45	1.5
20	16	1	6.33	25.49	-2.17	-1	-0.32	-0.17	1.52	1.56
20	24	1	6.35	25.52	-2.26	-1.23	-0.28	-0.25	1.29	1.35
20	24	1	6.35	25.53	-2.24	-1.2	-0.27	-0.24	1.32	1.37
20	32	1	6.21	25.66	-2.11	-1.08	-0.15	-0.11	1.44	1.46
20	32	1	6.22	25.67	-2.1	-1.04	-0.13	-0.09	1.49	1.5
20	40	1	5.09	27.24	-1.28	1.81	1.43	0.73	4.34	4.62
20	40	1	5.15	27.23	-1.28	1.86	1.42	0.72	4.38	4.66
20	44	1	4.78	26.33	-0.71	3.47	0.53	1.29	5.99	6.15
20	44	1	4.81	26.3	-0.72	3.4	0.5	1.28	5.92	6.08
20	48	1	4.3	33.73	0.02	9.45	7.93	2.02	11.97	14.5
20	48	1	4.28	33.67	0	9.42	7.87	2.01	11.94	14.45
20	52	1	4.14	35.2	-0.08	11.14	9.4	1.92	13.67	16.7
20	52	1	4.21	35.2	-0.04	11.13	9.4	1.96	13.65	16.69
20	57	1	4.1	37.94	-0.04	13.99	12.14	1.96	16.51	20.58
20	57	1	4.06	37.95	-0.07	13.98	12.15	1.93	16.5	20.58
20	74	1	3.89	41.1	-0.05	16.94	15.29	1.96	19.46	24.83
20	74	1	3.88	41.1	-0.05	17	15.29	1.96	19.53	24.88
20	0	2	6.34	25.44	-2.12	-1.1	-0.37	-0.12	1.43	1.48
20	0	2	6.33	25.43	-2.1	-1.08	-0.37	-0.09	1.44	1.49
20	8	2	6.35	25.56	-2.27	-1.16	-0.24	-0.26	1.36	1.41
20	8	2	6.35	25.54	-2.24	-1.14	-0.26	-0.23	1.38	1.42
20	16	2	6.34	25.58	-2.36	-1.03	-0.23	-0.36	1.49	1.55
20	16	2	6.37	25.57	-2.35	-0.99	-0.23	-0.35	1.53	1.58
20	24	2	6.32	25.47	-2.13	-1.06	-0.33	-0.12	1.46	1.5
20	24	2	6.33	25.48	-2.14	-1.07	-0.33	-0.13	1.45	1.49
20	32	2	6.2	25.45	-1.97	-0.91	-0.36	0.04	1.61	1.65
20	32	2	6.19	25.44	-1.94	-0.91	-0.37	0.06	1.62	1.66
20	40	2	5.06	27.3	-1.31	1.85	1.5	0.7	4.37	4.67
20	40	2	5.22	27.28	-1.26	1.85	1.48	0.75	4.37	4.68
20	44	2	4.68	29.08	-0.63	3.93	3.28	1.37	6.45	7.37
20	44	2	4.81	29.09	-0.68	3.96	3.29	1.33	6.49	7.39
20	48	2	4.28	33.81	0.16	9.55	8.01	2.16	12.08	14.65
20	48	2	4.31	33.82	0.16	9.56	8.02	2.17	12.08	14.66
20	52	2	4.18	34.83	0.16	10.98	9.03	2.17	13.5	16.38

Temperatura (°C)	Tiempo	Réplica	pH	L*	a*	b*	dL*	da*	db*	dE*
20	52	2	4.2	34.82	0.13	10.98	9.01	2.14	13.5	16.38
20	57	2	4.07	37.47	0.16	13.66	11.67	2.16	16.18	20.07
20	57	2	4.14	37.48	0.16	13.63	11.67	2.16	16.15	20.05
20	74	2	3.86	40.95	-0.06	16.93	15.14	1.94	19.45	24.73
20	74	2	3.87	40.92	-0.04	16.88	15.11	1.97	19.41	24.68
20	0	3	6.37	25.55	-2.32	-1.22	-0.25	-0.31	1.3	1.36
20	0	3	6.37	25.54	-2.31	-1.27	-0.26	-0.31	1.26	1.32
20	8	3	6.35	25.59	-2.25	-1.25	-0.21	-0.24	1.28	1.32
20	8	3	6.54	25.59	-2.23	-1.25	-0.21	-0.22	1.28	1.31
20	16	3	6.34	25.54	-2.31	-1.07	-0.26	-0.31	1.45	1.51
20	16	3	6.35	25.53	-2.31	-1.11	-0.27	-0.31	1.41	1.47
20	24	3	6.29	25.33	-1.78	-0.93	-0.47	0.22	1.59	1.68
20	24	3	6.28	25.31	-1.83	-0.94	-0.49	0.18	1.58	1.66
20	32	3	6.16	25.65	-2	-0.82	-0.15	0.01	1.7	1.71
20	32	3	6.18	25.64	-2	-0.86	-0.16	0.01	1.66	1.67
20	40	3	5.16	27.16	-1.4	1.65	1.36	0.6	4.18	4.43
20	40	3	5.21	27.12	-1.35	1.64	1.32	0.66	4.17	4.42
20	44	3	4.58	28.58	-0.63	3.33	2.78	1.37	5.86	6.63
20	44	3	4.78	28.57	-0.68	3.36	2.77	1.32	5.88	6.63
20	48	3	4.31	33.41	0.37	9.14	7.61	2.37	11.67	14.13
20	48	3	4.3	33.4	0.36	9.18	7.6	2.36	11.7	14.15
20	52	3	4.21	34.55	0.38	10.62	8.75	2.38	13.14	15.97
20	52	3	4.2	34.52	0.38	10.62	8.72	2.39	13.14	15.95
20	57	3	4.12	37.73	0.1	13.79	11.93	2.1	16.32	20.32
20	57	3	4.08	37.74	0.12	13.83	11.94	2.12	16.36	20.36
20	74	3	3.88	40.14	0.77	16.57	14.34	2.78	19.09	24.04
20	74	3	3.86	40.12	0.75	16.58	14.32	2.75	19.1	24.03
12	0	1	6.40	25.88	-2.25	-0.15	0.08	-0.24	2.38	2.39
12	0	1	6.44	25.89	-2.28	-0.15	0.09	-0.27	2.37	2.39
12	8	1	6.41	25.91	-2.2	-0.14	0.11	-0.19	2.38	2.39
12	8	1	6.37	25.9	-2.2	-0.14	0.1	-0.2	2.39	2.4
12	24	1	6.38	25.99	-2.05	-0.18	0.19	-0.05	2.34	2.35
12	24	1	6.38	25.98	-2.03	-0.19	0.18	-0.03	2.33	2.34
12	48	1	6.39	25.89	-2.02	-0.25	0.08	-0.02	2.28	2.28
12	48	1	6.43	25.87	-2.04	-0.29	0.06	-0.04	2.23	2.24
12	72	1	6.35	26.23	-2.04	-0.03	0.43	-0.03	2.49	2.53
12	72	1	6.36	26.22	-2.01	-0.07	0.42	0	2.45	2.49
12	95	1	6.39	25.9	-2.08	-0.07	0.1	-0.08	2.46	2.46
12	95	1	6.47	25.91	-2.14	-0.1	0.1	-0.14	2.42	2.43
12	144	1	6.25	25.96	-1.98	-0.03	0.16	0.02	2.49	2.5
12	144	1	6.34	25.96	-1.99	-0.05	0.16	0.01	2.47	2.48
12	168	1	6.28	26.03	-2.1	0.17	0.23	-0.1	2.69	2.7
12	168	1	6.04	26.01	-2	0.1	0.21	0	2.62	2.63
12	192	1	5.38	27.03	-1.35	1.5	1.23	0.65	4.02	4.25
12	192	1	5.68	27	-1.32	1.43	1.2	0.68	3.96	4.19
12	216	1	4.91	31.04	0.1	6.13	5.24	2.1	8.66	10.33
12	216	1	4.4	31.05	0.11	6.14	5.25	2.12	8.66	10.35
12	0	2	6.45	26.22	-2.96	-0.41	0.42	-0.96	2.11	2.36
12	0	2	6.45	26.22	-2.96	-0.41	0.42	-0.96	2.12	2.36
12	8	2	6.43	26.1	-2.42	-0.06	0.3	-0.42	2.46	2.51
12	8	2	6.46	26.09	-2.41	-0.09	0.28	-0.41	2.43	2.48
12	24	2	6.42	26.06	-2.13	-0.15	0.26	-0.13	2.38	2.39
12	24	2	6.4	26.06	-2.16	-0.09	0.25	-0.16	2.43	2.45
12	48	2	6.62	25.79	-2.09	-0.23	-0.01	-0.09	2.29	2.3
12	48	2	6.4	25.78	-2.1	-0.27	-0.02	-0.09	2.25	2.25
12	72	2	6.41	26.39	-2.36	-0.05	0.59	-0.36	2.47	2.56
12	72	2	6.38	26.39	-2.37	-0.06	0.59	-0.36	2.47	2.56
12	95	2	6.37	25.93	-2.07	-0.04	0.12	-0.07	2.48	2.49

Temperatura (°C)	Tiempo	Réplica	pH	L*	a*	b*	dL*	da*	db*	dE*
12	95	2	6.39	25.92	-2.12	0.03	0.12	-0.11	2.55	2.55
12	144	2	6.4	26.26	-2.72	-0.04	0.46	-0.72	2.48	2.63
12	144	2	6.34	26.27	-2.72	-0.04	0.46	-0.72	2.48	2.63
12	168	2	5.92	26.19	-2.17	0.33	0.39	-0.16	2.85	2.88
12	168	2	6.16	26.18	-2.17	0.34	0.38	-0.16	2.86	2.89
12	192	2	5.18	28.06	-0.46	2.75	2.26	1.54	5.27	5.94
12	192	2	5.01	28.01	-0.51	2.74	2.21	1.5	5.26	5.9
12	216	2	4.7	30.22	-0.32	5.16	4.42	1.69	7.68	9.02
12	216	2	4.72	30.21	-0.35	5.19	4.41	1.65	7.72	9.04
12	0	3	6.38	25.84	-2.2	-0.16	0.04	-0.19	2.37	2.37
12	0	3	6.37	25.84	-2.22	-0.21	0.04	-0.21	2.32	2.33
12	8	3	6.47	26.16	-2.43	-0.2	0.36	-0.43	2.32	2.39
12	8	3	6.4	26.16	-2.48	-0.23	0.36	-0.47	2.29	2.36
12	24	3	6.42	26.19	-2.48	-0.24	0.39	-0.47	2.29	2.36
12	24	3	6.41	26.18	-2.51	-0.16	0.38	-0.51	2.36	2.44
12	48	3	6.42	26.04	-2.51	-0.12	0.24	-0.5	2.41	2.47
12	48	3	6.47	26.03	-2.48	-0.19	0.23	-0.48	2.33	2.39
12	72	3	6.47	26.34	-2.4	-0.17	0.54	-0.4	2.36	2.45
12	72	3	6.43	26.36	-2.48	-0.12	0.55	-0.47	2.41	2.51
12	95	3	6.38	26.12	-2.52	-0.07	0.32	-0.52	2.45	2.52
12	95	3	6.43	26.11	-2.52	-0.05	0.31	-0.51	2.48	2.55
12	144	3	6.28	26.09	-2.17	0.12	0.29	-0.17	2.64	2.66
12	144	3	6.32	26.07	-2.22	0.09	0.27	-0.21	2.62	2.64
12	168	3	5.97	26.03	-1.94	0.25	0.23	0.06	2.77	2.78
12	168	3	6.17	26.04	-1.94	0.25	0.24	0.06	2.77	2.78
12	192	3	5.28	26.95	-1.07	1.38	1.15	0.94	3.91	4.18
12	192	3	5.77	26.96	-1.15	1.44	1.16	0.85	3.96	4.21
12	216	3	4.78	28.78	-0.26	3.67	2.98	1.75	6.2	7.09
12	216	3	4.96	28.78	-0.26	3.67	2.98	1.74	6.2	7.09

**Anexo 9: Gráfica de residuales del ajuste del modelo para el cambio de color a partir del pH en el indicador**





## Anexo 10: Tiempos de reacción en condiciones dinámicas de temperatura

Tiempos de respuesta para perfiles de temperatura generados aleatoriamente		
Caso	Tiempo (h) Crecimiento= $1 \times 10^5$ UFC/mL	Tiempo (h) Respuesta $\Delta E=8$
1	16	13
2	22	21
3	17	17
4	37	27
5	21	19
6	29	26
7	17	13
8	37	25
9	23	22
10	22	21

Tiempos de respuesta para perfiles de temperatura correspondientes a condiciones de abuso		
Caso	Tiempo (h) Crecimiento= $1 \times 10^5$ UFC/mL	Tiempo (h) Respuesta $\Delta E=8$
1	13	15
2	29	30
3	11	11
4	10	10
5	37	30
6	29	29
7	37	31
8	33	31
9	30	30
10	31	31