



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 741**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/22 (2006.01)
A23L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03735209 .3**
96 Fecha de presentación : **26.06.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1520034**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.04.2005**

54 Título: **Dispositivo de seguimiento a base de enzimas para el tratamiento térmico de objetos.**

30 Prioridad: **26.06.2002 GB 0214749**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.07.2011

73 Titular/es:
K.U. LEUVEN RESEARCH & DEVELOPMENT VZW
Groot Begijnhof, No. 59, Benedenstraat
B-3000 Leuven, BE
Centre Technique de la Conservation des Produits
Agricoles

72 Inventor/es: **Guiavarch, Yann;**
Van Loey, Ann y
Hendrickx, Marc

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivo de seguimiento a base de enzimas para el tratamiento térmico de objetos.

- 5 La presente invención se refiere al campo de tratamiento térmico de objetos, tales como alimentos, en condiciones de esterilización o pasteurización y más en particular se refiere a un dispositivo de seguimiento a base de enzimas para controlar el tratamiento térmico de pienso, alimento para seres humanos o animales u otro objeto, especialmente en condiciones de pasteurización o esterilización. La invención también se refiere al uso de una mezcla de carga enzimática deshidratada como un biointegrador para controlar el tratamiento térmico de objetos, por ejemplo, en forma de una etapa del procedimiento de pasteurización o esterilización. Además, esta invención se refiere a un método para controlar el impacto térmico del tratamiento térmico en un objeto.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 Hoy en día, una parte importante de la cadena de suministro alimenticio para seres humanos o ganado o animales consiste en alimentos conservados por un tratamiento térmico tal como escaldado, pasteurización o esterilización. En este contexto, es importante para los fabricantes de alimentos medir el impacto de los procedimientos térmicos en términos de seguridad y calidad en el contexto de diseño del procedimiento, optimización, evaluación y control.

- 20 El objeto del tratamiento térmico de los alimentos es conservar los alimentos frente al deterioro que podía hacer al alimento no apto para el consumo, por inactivación de microorganismos patógenos y/o de deterioro y de enzimas con acción deteriorante. Desafortunadamente, junto con estos efectos deseados, el tratamiento térmico también afecta a tanto la calidad nutricional como sensorial del producto. La tecnología de los alimentos intenta por lo tanto minimizar las pérdidas de calidad y al mismo tiempo proporcionar un procedimiento adecuado para conseguir el grado deseado de destrucción. Esta optimización es posible debido a la dependencia más pronunciada de la temperatura de la inactivación microbiana (esporas) cuando se compara con la velocidad de destrucción de la calidad, sensorial así como nutricional. Por lo tanto, el pertinente conocimiento de los datos cinéticos para la inactivación de microorganismos inducida por el calor y la evolución de la calidad es esencial para optimizar los procedimientos térmicos. Además, para fines de conservación, la medida cuantitativa del impacto de un procedimiento térmico en términos de seguridad y calidad es importante para el diseño del procedimiento, la evaluación y optimización para obtener un producto alimenticio seguro con máxima retención de la calidad.

- El impacto de un tratamiento por calor en un atributo de seguridad o calidad del producto alimenticio depende de las velocidades de las reacciones inducidas por calor que afectan a este atributo y a la vez el intervalo durante el que transcurren estas reacciones.

- El estado de un producto alimenticio, expresado en términos de su seguridad o calidad, se determina por el efecto de todas las reacciones que tienen lugar en el producto, integrado por la historia completa del producto hasta el momento del consumo. Este concepto se puede aplicar a una cadena de producción alimenticia completa (incluyendo la preparación y envasado, elaboración, distribución y almacenaje) o es aplicable a una operación de una sola unidad. Las velocidades a las que tienen lugar las reacciones deseadas y no deseadas (referidas a seguridad y calidad alimenticia) son función de tanto propiedades intrínsecas (es decir, específicas de los alimentos) como extrínsecas (es decir, específicas del procedimiento).

- 45 La elaboración de pienso para ganado es también una fuente de riesgo potencial tanto para el propio ganado (por ejemplo, la denominada "enfermedad de las vacas locas") como posiblemente incluso para carne para consumo humano de animales infectados. La Directiva del Consejo Europeo 90/667/EEC de 27 de noviembre de 1.990, Anexo II, capítulo II, sección G, requiere que el desperdicio de animales con alto riesgo se debe tratar a una temperatura de núcleo de 133°C durante 20 minutos a una presión de 3×10^5 Pa (3 bar). Sin embargo, debido a zonas muertas en el transporte rápido de algunas partículas, la residencia requerida puede no conseguirse.

- Debido a que en el tratamiento térmico de los alimentos, la temperatura es el principal factor extrínseco para garantizar la seguridad y la calidad durante la producción y el almacenaje de productos alimenticios, la presente invención hace frente principalmente a sistemas para los que la temperatura es el único factor extrínseco determinante de la velocidad.

- Comúnmente se usan dos modelos para cuantificar la influencia de la temperatura en la velocidad de inactivación de aspectos de seguridad así como de calidad: el modelo de Arrhenius (1.889) usado comúnmente en el campo de la cinética de las reacciones químicas y el modelo del Tiempo de Destrucción Térmica (1.921), especialmente para cinéticas de primer orden y usados comúnmente en termobacteriología y en el campo de tratamiento térmico. Estos dos modelos son conocidos en la técnica y no se requiere que se describan más en la presente memoria.

- El impacto de un tratamiento térmico en un atributo de los alimentos se cuantifica normalmente por supuesto usando el concepto de un "tiempo equivalente a una temperatura de referencia", referido como el valor F del procedimiento (normalmente expresado en minutos). Este concepto traduce el perfil de las variables tiempo-temperatura en un tiempo equivalente elegido a una temperatura de referencia constante que afectará al atributo de la calidad de la

misma manera que el perfil variable. En otras palabras, F representa el tiempo equivalente a una temperatura T_{ref} de referencia constante elegida que daría como resultado exactamente el mismo impacto en el atributo de calidad específica que el perfil de las variables tiempo-temperatura real al que se sometió el alimento (es decir, el atributo de interés). Matemáticamente, F se puede escribir en términos de la historia de la temperatura del producto o

alternativamente en términos de un estado de respuesta antes y después del tratamiento. El impacto de un tratamiento por calor sobre el atributo de la seguridad o la calidad de un producto depende de las velocidades de las reacciones inducidas por calor que afectan a este atributo y del intervalo de tiempo de reacción durante el que tienen lugar las velocidades de estas reacciones.

En la práctica, casi nunca tienen lugar perfiles de calentamiento isotérmico debido a que los equipos de calentamiento requieren tiempo para alcanzar la temperatura de mantenimiento del proceso y requieren tiempo para enfriamiento y debido a la transferencia de calor en el interior del producto. Por lo tanto, las velocidades de reacción están variando como una función del tiempo del proceso. El valor del procedimiento se define como la integral en el tiempo de la velocidad de cada temperatura encontrada referente a la velocidad a una temperatura de referencia elegida.

Por lo tanto, basándose en la historia de temperaturas del aspecto del producto, o registrada o simulada, junto con el conocimiento de la cinética del aspecto seguido, el impacto del procedimiento térmico en ese atributo se puede calcular como se mencionó anteriormente, esta propuesta se refiere comúnmente como el método físico-matemático.

Además, el impacto de un tratamiento térmico sobre un parámetro específico también se puede determinar contando solamente con el estado inicial y final del parámetro de interés y en su cinética. Basándose en el estado de respuesta de un atributo antes y después de tratamiento térmico, junto con su cinética, el impacto del tratamiento se puede calcular dependiendo del orden de la reacción inducida por calor que produce este atributo. En el caso de que el nivel del atributo de calidad real de interés se mida antes y después del tratamiento, esta propuesta se refiere como el método *in-situ*.

Como resumen, el método *in-situ* y la aproximación físico-matemática son dos técnicas de evaluación comunes en el control del tratamiento térmico de los alimentos. En el método *in-situ* el nivel de un atributo de calidad o seguridad (es decir, contenido en tiamina) se mide en el alimento mismo antes y después de tratamiento por calor, mientras el método físico-matemático se basa en el conocimiento de la historia del tiempo-temperatura del producto, junto con el conocimiento de parámetros de resistencia al calor del atributo de calidad de los alimentos en estudio.

En el método *in-situ* se siguen los cambios en el atributo de calidad o seguridad real en estudio antes y después del tratamiento para proporcionar información directa y precisa sobre el estado del atributo de interés. El valor del procedimiento se puede calcular dependiendo del orden de la reacción inducida por calor que ocurre en el atributo objetivo. La principal ventaja del método *in-situ* es que el impacto del tratamiento sobre el parámetro de interés se conoce directamente y con precisión. Sin embargo, en la práctica, el análisis del parámetro en investigación (es decir, medición de recuentos microbianos, textura, contenido en vitaminas, etc.), puede ser laborioso, exigir mucho tiempo y/o ser caro y en algunos casos incluso es imposible debido al límite de detección de las técnicas analíticas en los requerimientos de destreza/o de muestreo (por ejemplo, para la seguridad de alimentos enlatados con bajo contenido en ácidos, esterilizados, las políticas de salud pública imponen que la probabilidad de una unidad no estéril no debería exceder de 10^{-9}), que no se puede controlar.

En el método físico-matemático, el cálculo del valor del procedimiento impuesto en el alimento o requiere el uso de sensores de temperatura para registrar la historia tiempo-temperatura en el punto crítico del producto o requiere el uso de disoluciones teóricas de modelos de transferencia de calor o de métodos semi-empíricos (por ejemplo, el método de Ball and Olson usado comúnmente en la industria) que usa el conocimiento de parámetros del tratamiento y parámetros de penetración del calor del propio producto alimenticio junto con conocimiento de la cinética del atributo de seguridad/calidad en estudio.

Con respecto a métodos semi-analíticos tales como el método de Ball and Olson, pueden surgir diversos problemas:

- el registro directo del perfil tiempo-temperatura del producto no puede ser posible en algunas condiciones del tratamiento, por ejemplo, las sondas térmicas con cable no se pueden usar en tratamiento térmicos continuos y los sensores térmicos sin cable perturban demasiado la transferencia de calor en el producto;
- el punto crítico de un producto, excepto para productos conductores reales, casi siempre se desplaza durante el procedimiento de calentamiento (o son discontinuos o continuos, una serie de tratamientos de calor someten a los productos a rotación axial o extremo sobre extremo para aprovechar sus características convectivas para aumentar la velocidad de calentamiento).

Mejorando los requerimientos de seguridad y calidad, las políticas de ahorro de energía y los aspectos de los consumidores, han dado como resultado la optimización de tecnologías térmicas clásicas y el desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías (térmicas así como no térmicas) tales como procedimientos continuos en retortas rotatorias,

calentamiento volumétrico antes de tratamientos asépticos, uso de pulsos de alto campo eléctrico, tratamiento a alta presión, tecnología de infrarrojos, etc. Frente a estas nuevas tecnologías, los métodos *in-situ* y físico-matemáticos muestran serias limitaciones. Esto es el por qué se han realizado considerables esfuerzos en el desarrollo de integradores de la historia del producto tales como Integradores de Tiempo-Temperatura (de ahora en adelante referidos como ITT) para tratamientos térmicos. El ITT permite determinar rápidamente, fácilmente y con precisión *post factum* el impacto de un cierto tratamiento térmico sobre un atributo del producto sin conocimiento de la historia tiempo-temperatura del producto.

Hasta ahora, se usan ITT principalmente microbiológicos para seguir el tratamiento térmico de los alimentos desde un punto de vista de la seguridad. Sin embargo, las desventajas inherentes asociadas a los métodos de detección microbiológica han estimulado la investigación de alternativas. Las ventajas y desventajas de diversas clases de ITT se han revisado por Hendrickx et al. en *Critical reviews in Food Science and Nutrition* (1.995) 35 (3): 231-262 y por Van Loey et al. en *Trends in Food Sciences, & Technology* (1.996) 7 (1): 16-26.

Se han desarrollado diversos sistemas enzimáticos para evaluar el impacto de procedimientos de pasteurización y esterilización, entre otros, sobre atributos objetivo microbiológicos tales como esporas *Clostridium botulinum*. Aunque estos sistemas ITT a base de α -amilasa son herramientas de investigación valiosas, sigue existiendo la necesidad de un sistema enzimático aplicable industrialmente que sea preciso, económico y conveniente para usarlo para el seguimiento de procedimientos de esterilización a gran escala.

Un ITT se puede definir como un dispositivo de medida sin cables pequeño que muestra un cambio irreversible medible fácilmente, con exactitud y con precisión, dependiente del tiempo-temperatura, que imita el cambio de un atributo objetivo que experimenta la misma exposición a temperatura variable. Su principal ventaja es la capacidad para cuantificar el impacto integrado con el tiempo-temperatura en un atributo objetivo sin requerir información sobre la historia real de la temperatura del producto. Idealmente, un ITT debería satisfacer los siguientes criterios:

- 1) ser económico, rápido y fácil de preparar, fácil de recuperar y dar una lectura exacta y favorable para el usuario,
- 2) el ITT se debería incorporar en el alimento sin perturbar la transferencia de calor en el alimento; la presencia del ITT no debe cambiar el perfil tiempo-temperatura del alimento y el ITT se debería exponer al mismo perfil tiempo-temperatura que el atributo objetivo que se está investigando,
- 3) el ITT debería cuantificar el impacto del procedimiento en el atributo objetivo en estudio, es decir, tiene que satisfacer requerimientos cinéticos. La dependencia de la temperatura de las constantes de velocidad de ITT y el atributo objetivo se debería describir por el mismo modelo (por ejemplo, el modelo de Arrhenius o el modelo del Tiempo de Destrucción Térmica). Como requerimiento cinético también es importante que el ITT posea un valor de velocidad de inactivación por calor aceptable a la temperatura de tratamiento deseada. Si ese valor es demasiado alto, el ITT se puede inactivar casi totalmente de manera que la respuesta del ITT puede estar por debajo del límite de detección del método de lectura. Por el contrario, un valor demasiado bajo puede conducir a un cambio de la respuesta del ITT que sea demasiado limitada para una detección precisa de los cambios.

El ITT se puede clasificar en términos de principio de trabajo, tipo de respuesta, origen, aplicación en el material alimentario y localización en el alimento como se muestra en Hendrickx et al. (referido *supra*). Dependiendo de los principios de trabajo, el ITT se puede subdividir en sistemas biológicos (microbiológicos y enzimáticos), químicos y físicos. En relación a su origen, se pueden distinguir ITT extrínsecos e intrínsecos.

Con respecto a la aplicación del ITT en el producto alimenticio, se pueden distinguir tres propuestas (disperso, permeable o aislado):

- en sistemas dispersos, el ITT (extrínseco o intrínseco) se distribuye homogéneamente por el alimento, permitiendo la evaluación del impacto promedio del volumen de un procedimiento; además de la dispersión de ITT extrínseco en el alimento, el ITT extrínseco puede ser permeable (permitiendo algo de difusión de componentes alimenticios en el ITT) o aislado.
- en ITT disperso y permeable, la temperatura ya no es el único factor que puede influir en la respuesta del ITT. Las propiedades intrínsecas del alimento tales como salinidad, pH, etc... también pueden influir en la cinética del ITT. Estas propiedades intrínsecas se deberían tener en cuenta cuando se desarrolla un ITT disperso o permeable. Por lo tanto, sigue siendo posible calcular un valor del procedimiento debido a que el ITT y el atributo objetivo muestran la misma cinética de inactivación en las mismas condiciones ambientales del procedimiento de esterilización.

También se ha propuesto ITT encapsulado para evitar la influencia del entorno del alimento sobre el comportamiento cinético del ITT. En este caso, el ITT se aísla completamente del entorno del alimento embebiéndolo en un material portador inerte tal como vidrio, plástico o metal. Por lo tanto, la temperatura llega a ser el único factor que influye. Es necesario elegir un portador de ITT con una resistividad térmica tan pequeña como sea posible para determinar que la respuesta observada del ITT es debida al calentamiento del producto alimenticio y no está limitada por el

calentamiento del material portador. Por ejemplo, el uso de sistemas portadores de metal altamente conductores sellados herméticamente o roscados, pequeños, garantiza la eliminación de cualquier influencia del entorno distinta de la temperatura y permite su incorporación en un producto alimenticio real. Algunas de las propiedades requeridas que debería satisfacer cualquier sistema portador de ITT incluyen:

- una difusividad térmica tan próxima como sea posible a la del alimento,
- en el caso de alimento en forma de partículas calentado en un procedimiento rotatorio (por ejemplo rotación extremo sobre extremo) o un procedimiento continuo (por ejemplo, tratamiento aséptico), el portador de ITT debería poseer (una vez cargado con ITT) la misma densidad y, si es posible, una forma similar a la de la partícula crítica para imitar tanto como sea posible el movimiento de la partícula durante el procedimiento. Para cada líquido o alimento en forma de partículas, se requiere realizar un estudio previo de la conductividad térmica, forma, densidad, para determinar la partícula crítica que se tiene que imitar por el portador,
- el portador de ITT debería poseer una resistencia mecánica aceptable para conservar su forma cuando se somete a tensión mecánica (por ejemplo, alimento en forma de partículas bombeado durante procedimientos de calentamiento volumétrico o intercambiador de calor de raspados superficiales) y
- el material portador se debería adaptar al procedimiento de calentamiento usado (por ejemplo, evitar el uso de portador metálico con calentamiento óhmico o con microondas).

Bacillus sp. son los más usados comúnmente para el desarrollo de ITT microbiano en las industrias alimenticias y farmacéuticas. Se pueden distinguir dos clases de ITT microbianos:

- sistemas de reducción de recuentos que permiten calcular un valor del procedimiento y
- sistemas superviviente/destrucción que sólo permiten identificar si el procedimiento térmico fue suficiente (no crecimiento) o no (crecimiento) para destruir una cantidad dada de microorganismos presentes en el alimento.

La principal desventaja de cualquier sistema de seguimiento microbiano es el tiempo requerido para realizar el ensayo. El largo tiempo de incubación (de 24 horas hasta varios días) y la lectura del sistema no permiten la intervención rápida en cualquier clase de fallo (sistemático) o desviación del procedimiento. La microbiología cuantitativa se tiene que realizar mediante mano de obra especializada y la precisión analítica de las técnicas disponibles en la actualidad es más bien baja. La determinación de la resistencia al calor de las esporas requiere una calibración rigurosa. Esta etapa para determinar el poder de destrucción de un tratamiento por calor dado es difícil de conseguir. Las limitaciones inherentes de métodos de detección microbiológicos en la determinación de la eficacia de tratamiento térmico, junto con el tiempo y gasto asociado a estos métodos, han impulsado la investigación de alternativas.

El potencial de sistemas a base de proteínas, en particular sistemas a base de enzimas, está recibiendo un considerable interés. La facilidad relativa de lectura y manipulación de sistemas enzimáticos ofrece una ventaja significativa sobre ITT microbianos. Por otra parte, el intervalo de cinética de desnaturalización por calor de las proteínas incluye los valores típicos para aspectos tanto de seguridad como de calidad. En general, la inactivación enzimática se caracteriza por un valor z en el intervalo de 6,5°C a 55°C, mientras que el valor z de la inactivación térmica de células vegetativas y esporas es 4,5 a 12°C y para aspectos de calidad (por ejemplo, color, textura, aroma, vitaminas) en el intervalo de 25 a 45°C. Estas características son de interés con respecto a consideraciones de seguridad debido a que el diseño de los procesos de esterilización para alimentos enlatados con bajo contenido en ácidos se dirige a la destrucción de esporas de cepas proteolíticas de *Clostridium botulinum* con un valor de z de 10°C. Para la evaluación de la seguridad de los procedimientos de pasteurización se han adelantado diversos microorganismos con valores de z oscilando de 5 a 12°C para uso como organismo de referencia debido a que dependiendo del tipo de alimento, tiempo de durabilidad deseado, los diferentes microorganismos podrían ser la causa principal de envenenamiento. En sistemas de seguimiento a base de enzimas, con frecuencia la actividad enzimática permanece después de ensayar el tratamiento por calor para determinar el impacto térmico, aunque otras propiedades, tales como el calor de alteración enzimática, se pueden determinar en su lugar (por ejemplo, usando Calorimetría Diferencial de Barrido, de ahora en adelante referida como DSC).

Las amilasas de diferentes especies de *Bacillus* se han estudiado con la mayor frecuencia. Se ha evaluado la factibilidad del ITT usando α -amilasas de *Bacillus licheniformis* inmovilizadas mediante enlaces covalentes sobre perlas de vidrio o α -amilasa de *Bacillus subtilis* (a más del 10% de contenido de humedad) o α -amilasas de *Bacillus amyloliquefaciens* en presencia de polioles, incluyendo carbohidratos. Aunque estos sistemas de ITT a base de α -amilasa son herramientas de investigación valiosas, presentan las siguientes limitaciones:

- el intervalo de valores del procedimiento que se puede investigar (a lo sumo 14 minutos) es demasiado bajo con respecto a grandes valores del procedimiento observados en la industria (aproximadamente 60

minutos o más),

- son difíciles de preparar y requieren mucho tiempo (aproximadamente 3 semanas),
- requieren una cantidad significativa de enzima (aproximadamente 10 mg por ITT o más),
- se usa entalpía residual de desnaturalización, que requiere equipo DSC caro, como la propiedad principal de la respuesta,
- apenas se usa actividad residual como propiedad de la respuesta debido a que el fenómeno de agregación de las proteínas causa dificultades en la solubilización de la enzima antes de la lectura de la actividad,
- son muy poco estables durante el almacenaje entre la preparación y el uso,
- son muy poco estables durante el almacenaje entre el calentamiento y la lectura.

Como consecuencia, un sistema enzimático aplicable en la industria, preciso, económico y conveniente para aplicaciones industriales es aún una necesidad en la técnica.

La patente de EE.UU. 5.486.459 describe un indicador de esterilización que comprende enzimas inmovilizadas en un disco de celulosa y liofilizadas. El disco se inserta en un vial y se cubre con aceite de parafina. Se usa un tapón de esponja resistente al calor para mantener el aceite de parafina y el disco en su lugar en el vial.

SUMARIO DE LA INVENCION

Para superar las limitaciones de los sistemas a base de enzimas de la técnica anterior, la presente invención proporciona un sistema de ITT enzimático eficaz y clásico y método que permite usar una cantidad muy pequeña, preferiblemente una cantidad no mayor que 3 mg de una enzima como componente de un integrador tiempo-temperatura preciso, económico y conveniente, cuando se muestra inactivación de primer orden, para seguimiento del impacto del tratamiento térmico (en particular esterilización) en alimentos para seres humanos o animales, pienso para ganado, herramientas médicas y otros objetos. Este procedimiento es aplicable convenientemente a amilasa de *Bacillus licheiformis* y α -amilasa de *Bacillus subtilis*, aunque se puede usar también una serie de otras enzimas.

El sistema y método de la invención hacen uso, junto con esta muy pequeña cantidad de una enzima, de una primera carga preferiblemente en forma de perlas no porosas (por ejemplo, hechas de vidrio) para evitar el fenómeno de agregación mencionado anteriormente. Se desprenden diversas ventajas de la invención. La principal ventaja es que las enzimas se diluyen eficazmente en la carga, por ejemplo se extiende o se adsorbe todo sobre las superficies de las perlas, para evitar la agregación durante el calentamiento que conduce, después del calentamiento, a una red de proteínas imposible de solubilizarse para medición de la actividad posterior. Por lo tanto, se usan perlas de vidrio no sólo como superficie de adsorción simple que permite fijar la enzima, sino también como carga que separa las moléculas enzimáticas entre sí.

Otra ventaja importante es que se puede usar una cantidad muy pequeña de enzima, preferiblemente una cantidad no mayor que 3 mg para preparar el ITT de la invención y que esta pequeña cantidad se puede solubilizar fácilmente para la determinación de actividad residual adicional.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un primer aspecto, esta invención proporciona un dispositivo para seguimiento a base de enzimas para seguir el impacto térmico del tratamiento térmico en un objeto en un intervalo de temperatura de 80°C a 160°C, comprendiendo dicho dispositivo un envase que contiene al menos una enzima y al menos una barrera, en la que:

- dicho envase es un envase herméticamente cerrado y
- dicho envase encierra una mezcla deshidratada sólida que comprende al menos dicha enzima y al menos una primera carga, en la que el contenido en agua de dicha mezcla deshidratada está por debajo de 0,6 en peso, cierre hermético del envase sellado herméticamente que se obtiene mediante al menos dicha barrera para evitar la entrada de humedad en dicho envase, por ejemplo, cuando se pone lo último en una atmósfera de contenido en humedad alto durante tratamiento térmico del objeto. Se conocen materiales barrera de vapor de humedad en la técnica e incluyen, por ejemplo, una variedad de polímeros que contienen silicio.

En el dispositivo según la invención, el contenido en agua de dicha mezcla deshidratada sólida está por debajo de 0,6% en peso, más preferiblemente por debajo de 0,3% en peso e incluso más preferiblemente por debajo de 0,1%

en peso de dicha mezcla. La determinación del contenido en agua residual en dicha mezcla deshidratada sólida se puede realizar por cualquier método analítico clásico de la técnica, tal como pero no limitado a, metodología Karl Fisher de gravimetría (pérdida por secado) o colorimétrica. Se pueden encontrar detalles de dichos métodos por ejemplo en la Guía de Administración de Fármacos y Alimentos de EE.UU. (enero de 1.990) para humedad residual en productos biológicos secos.

Preferiblemente, en el dispositivo según la invención, al menos una enzima representa entre 0,001 y 10% en peso, preferiblemente entre 0,02 y 5% en peso, de la mezcla deshidratada sólida encerrada en el envase sellado, mientras que al menos una primera carga representa entre 90 y 99,999% en peso, preferiblemente entre 95 y 99,98% en peso de la mezcla deshidratada sólida.

Preferiblemente, al menos una primera carga es una carga no porosa que puede ser o una carga inorgánica, por ejemplo seleccionada del grupo que consiste en perlas de vidrio, perlas de metal y perlas de sílice o una carga orgánica, por ejemplo perlas poliméricas.

La forma geométrica de la primera carga no es crítica para la presente invención, aunque puede ser una ventaja una forma regular. Preferiblemente, al menos una primera carga consiste en perlas con un tamaño medio por debajo de aproximadamente 0,3 mm.

En muchos casos, puede ser ventajoso cuando el dispositivo de la invención comprende además al menos una segunda carga que puede representar hasta aproximadamente 10%, preferiblemente hasta 5%, más preferible hasta 3% en peso de la mezcla deshidratada sólida.

Al menos una segunda carga puede ser una carga soluble en agua y puede ser o una carga orgánica, por ejemplo seleccionada del grupo que consiste en polioles y carbohidratos tales como manitol, glicerol, sorbitol, lactitol, sacarosa, trehalosa y alcohol polivinílico o una carga inorgánica, por ejemplo seleccionada del grupo que consiste en sales de metal alcalino y alcalino-térreo, tales como haluros de metal alcalino y alcalino-térreo, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de calcio o cloruro de potasio. Combinaciones de una carga orgánica y una carga inorgánica pueden proporcionar un perfil de segunda carga ventajoso.

La presente invención es ampliamente aplicable a un gran intervalo de enzimas de origen bacteriano, vegetal, animal o fúngico. La invención es aplicable a enzimas que pertenecen a cualquiera de las seis clases de la clasificación y nomenclatura internacional de las enzimas, es decir, oxidoreductasa, transferasa, hidrolasa, liasa, isomerasa y ligasa. En particular, una enzima adecuada es una α -amilasa o una pectino metil esterasa. Si se requiere, se pueden seleccionar otras enzimas adecuadas del grupo que consiste en: α -glucosidasa, glucoamilasa, ureasa, deshidrogenasa, fosfatasa, cinasa, pululanasa, glucosiltransferasa y similares. Enzimas adecuadas para los fines de esta invención también incluyen enzimas de arqueas o bacterias termoestables que demuestran estabilidad de las proteínas en condiciones extremas, a veces referidas como extremófilos.

Según una realización ventajosa de la invención, la cantidad de al menos una enzima en el dispositivo está por debajo de aproximadamente 3 mg, preferiblemente no por encima de 2 mg, más preferiblemente no por encima de 1 mg.

Preferiblemente, el envase sellado del dispositivo según la invención se fabrica de uno o más materiales impermeables a la humedad seleccionados del grupo que consiste en vidrio, sílice, metales (por ejemplo, acero inoxidable, aluminio o titanio) y polímeros, especialmente polímeros no hidrolizables y polímeros que resisten atmósferas de humedad del calor sin degradación. El envase sellado puede estar fabricado de una o más capas, especialmente un material multicapa puede ser adecuado dependiendo de la elección del principal material del envase. El envase del dispositivo según esta invención se sella preferiblemente de tal manera que se evite que el contenido en humedad de la mezcla deshidratada sólida encerrada en dicho envase exceda de aproximadamente 0,6% en peso, preferiblemente 0,3% en peso, más preferiblemente 0,1% en peso de dicha mezcla. Se detallarán en la presente invención a continuación métodos y materiales para sellar el envase de esta invención.

También se describe el uso de una mezcla deshidratada sólida que comprende al menos una carga y al menos una enzima como biointegrador para seguir el tratamiento térmico de un objeto dentro de un intervalo de temperatura de aproximadamente 60°C a 160°C, alternativamente 70°C a 140°C, convenientemente de 80°C a aproximadamente 130°C. Dicho objeto puede estar presente en cualquier forma física, pero preferiblemente en al menos una forma parcialmente sólida, más preferiblemente está en uniforma de partículas que pueden estar dispersadas en un líquido. Por ejemplo, dicho objeto puede ser alimento tal como conservantes, en particular sopa, verduras, carne, pescado o platos precocinados, incluyendo cualquiera de los últimos, opcionalmente junto con una salsa u otra clase de condimento, haciéndose en un reactor de autoclave continuo o discontinuo.

En otra realización, dicho objeto puede ser cualquier objeto que, para fines higiénicos puede requerir que se desinfecte en condiciones de esterilización, tal como una herramienta médica que se tiene que usar en procedimientos quirúrgicos o un dispositivo médico que se tiene que implantar en el cuerpo de un paciente, tal como un implante de hueso o cartílago. Dicho objeto también puede ser una composición farmacéutica, preferiblemente en

forma de un líquido, jarabe, crema o pasta.

Para este uso, el seguimiento del tratamiento térmico de un objeto se basa preferiblemente en la medida de la actividad enzimática residual después de dicho tratamiento térmico. Así, puede ser en forma de una etapa de procedimiento en un procedimiento de pasteurización (a temperaturas que oscilan de aproximadamente 60°C a 100°C) o un procedimiento de esterilización (a temperaturas que oscilan de aproximadamente 100°C a 160°C, por ejemplo, 140°C).

En un segundo aspecto, esta invención proporciona un método para seguir el impacto de tratamiento térmico sobre un objeto mediante un dispositivo de seguimiento a base de enzimas, comprendiendo dicho dispositivo un envase que contiene al menos una enzima y al menos una barrera, comprendiendo dicho método las etapas de:

- (a) poner dicho dispositivo de seguimiento a base de enzimas en contacto con dicho objeto o en las proximidades de dicho objeto;
- (b) exponer dicho objeto y dicho dispositivo de seguimiento a base de enzimas a tratamiento térmico a una temperatura dentro de un intervalo de 80°C a 160°C durante suficiente tiempo para degradar una porción sustancial de al menos dicha enzima sin rotura de al menos dicha barrera de dicho envase;
- (c) retirar dicho envase del contacto con dicho objeto o de las proximidades de dicho objeto después de la terminación de la etapa (b);

caracterizado por que:

- dicho envase es un envase herméticamente cerrado,
- dicho envase encierra una mezcla deshidratada sólida que comprende al menos dicha enzima y al menos una primera carga, en el que el contenido en agua de dicha mezcla deshidratada está por debajo de 0,6% en peso, cierre hermético del envase herméticamente sellado que se obtiene mediante al menos dicha barrera para evitar la entrada de humedad en dicho envase durante el tratamiento térmico de dicho objeto y
- dicho método comprende además las etapas de:
 - (d) abrir dicho envase herméticamente sellado y obtener una muestra de al menos una enzima de dicho envase herméticamente sellado;
 - (e) medir la actividad residual de al menos dicha enzima en la muestra obtenida y
 - (f) usar la actividad residual medida como medio para cuantificar el impacto térmico del tratamiento térmico de la etapa (b) en uno o más atributos objetivo dados de dicho objeto.

Idealmente, en vista de la etapa de cuantificación (f), la actividad de al menos dicha enzima también se debería determinar antes del tratamiento térmico.

En este segundo aspecto de la invención, términos tales como "objeto", "mezcla", "envase", "sellado", "primera carga" y similares se debería entender que se definen de una manera similar a los aspectos primero y segundo de la invención. No se requiere que el dispositivo de la invención, para un seguimiento eficaz y preciso, esté en contacto directo con el objeto sometido a tratamiento térmico, aunque se puede poner en la superficie de dicho objeto o, especialmente en el caso de que dicho objeto sea alimento, dentro de dicho alimento. Es suficiente que se ponga el dispositivo de la invención a corta distancia del objeto sometido a tratamiento térmico, de tal manera que la historia térmica de la mezcla deshidratada encerrada en el envase sellado sea suficientemente similar a la historia térmica del objeto. La determinación de la distancia máxima adecuada, dependiendo de las condiciones de tratamiento térmico (temperatura y tiempo) y de la naturaleza exacta del objeto está más allá del conocimiento del experto en la materia.

También, las proporciones de la enzima y/o la primera carga (orgánica o inorgánica, preferiblemente no porosa) en la mezcla deshidratada, así como otros parámetros opcionales tales como, pero no limitados a, la cantidad de la enzima y/o la presencia opcional de una o más segundas cargas y las proporciones de la misma en la mezcla deshidratada, son como se describió anteriormente con respecto al primer aspecto de la invención.

En una realización preferida y la más conveniente de la invención, el método para seguir el impacto térmico de tratamiento térmico en un objeto según la invención se caracteriza además por que:

- en la etapa (d), una muestra de al menos una enzima de dicho envase sellado se obtiene en forma de una disolución enzimática por solubilización en o más disolventes de la fracción de dicha mezcla

deshidratada sólida que comprende al menos dicha enzima y

- en la etapa (e) dicha disolución enzimática se pone en contacto con un sustrato para al menos dicha enzima, dando como resultado un producto, y el seguimiento de la actividad residual de al menos dicha enzima se efectúa por cuantificación de la velocidad de formación de dicho producto.

El experto sabe qué disolvente o combinación de disolventes puede ser adecuada para solubilizar de manera satisfactoria al menos una enzima de la muestra tomada del envase sellado, dependiendo de la naturaleza específica de dicha enzima y dependiendo de la segunda o segundas cargas opcionalmente presentes en la mezcla deshidratada.

Dentro del método de seguimiento del impacto térmico del tratamiento térmico en un objeto según la invención, el atributo objetivo dado de dicho objeto que se tiene que cuantificar en la etapa (f) puede ser cualquier clase de atributo objetivo que sea relevante para el objeto implicado. Por ejemplo, puede ser ventajosamente una propiedad microbiológica de dicho objeto que ayude en la comprobación y control de la condición sanitaria de dicho objeto antes de cualquier uso adicional. También puede ser, especialmente en el caso de que el objeto sea alimento para seres humanos o animales o pienso, una propiedad química, física u organoléptica que sea relevante para el gusto, valor nutricional o aspecto visual del alimento o pienso tal como, pero no limitado a, viscosidad, color, contenido en azúcar, contenido en grasa, contenido en vitaminas y similares.

Debido a las numerosas ventajas explicadas en la presente memoria anteriormente, la presente invención es aplicable a un amplio intervalo de industrias, incluyendo la industria de alimentación humana o animal, la industria del marisco, la industria de derretimiento de grasas así como al cuidado de la salud y la medicina y a un amplio intervalo de procedimientos industriales en los que está implicado el calor u otros procesos térmicos en una o más etapas de fabricación.

En particular, es útil en el contexto de un sistema de Puntos de Control Críticos de Análisis de Peligros (de ahora en adelante referido como HACCP, por sus siglas en inglés). Se apreciará que en todos estos campos de aplicación, el dispositivo y el método de la invención contribuirán a una mejor seguridad del producto, deterioro disminuido y procedimientos de fabricación menos caros.

Las características adicionales y ventajas de la invención se explicarán ahora con más detalle desde un punto de vista práctico. Sin embargo, se debería entender que la presente invención no está limitada a estas características más específicas.

La presente invención permite obtener ITT preciso y reproducible con un valor de z en el intervalo de aproximadamente 8 a 18°C, preferiblemente con una desviación estándar no mayor que 0,8°C, preferiblemente no mayor que 0,5°C, permitiendo de ese modo la determinación de un valor F del procedimiento (tal como se define en los fundamentos de la invención) con una precisión aceptable.

Más específicamente, la invención hace uso de una mezcla que comprende una enzima fuertemente deshidratada adsorbida en la superficie de perlas de vidrio no porosas junto con sustancias estabilizantes (tal como sacarosa y sales minerales) como una segunda carga. Esta mezcla se envasa en un envase herméticamente cerrado, por ejemplo cápsulas pequeñas recubiertas por una capa de silicona hermética. Es importante el uso de una primera carga, por ejemplo, perlas de vidrio de aproximadamente 0,25 mm de diámetro. Para conseguir esta mezcla deshidratada sólida, la invención hace uso de una etapa de extradeshidratación, en el interior de un horno a una temperatura muy por encima de la temperatura ambiente, seguido por un sellado inmediato de las cápsulas y una inclusión en el interior de un material barrera de la humedad de silicona. A partir de estas tres etapas (extra-deshidratación, sellado inmediato e inclusión en silicona) derivan diversas ventajas:

- un buen control del nivel de deshidratación de la mezcla en el interior de cada cápsula y logro posterior de un buen nivel de precisión de la respuesta del ITT (ITT muestra valor z constante reproducible y estable),
- un alto nivel de estabilidad térmica que permite determinar el impacto térmico a temperatura mayor que 100°C y hasta aproximadamente 160°C, por ejemplo 140°C y
- una capacidad para almacenar el ITT entre su preparación y su uso y entre su uso y su lectura.

Por otra parte, la mezcla envasada es fácil de retirar rápidamente de cápsulas de DSC recubiertas con silicona. La enzima de esta mezcla envasada muestra las siguientes características funcionales:

- después de la determinación de sus parámetros de inactivación por calor (valores D o valor z), permite seguir valores del procedimiento a exposición a alta temperatura; por ejemplo, cuando se usa α -amilasa *Bacillus Hcheniformis* (de ahora en adelante referida como BLA), es posible seguir valores del procedimiento hasta alrededor de 70 minutos dentro de un intervalo de temperatura de aproximadamente

100 a 140 °C,

- es fácil, por adición de una pequeña cantidad (aproximadamente 1 ml) de agua a la mezcla deshidratada contenida en un envase y mezclamiento rápido para obtener rápidamente una desorción total o sustancial de al menos una enzima de la superficie de la primera carga (perlas),
- muestra una gran estabilidad (varios meses) de sus valores D y valor z, cuando el envase sellado (por ejemplo, recubierto con silicona como medio de cierre) se almacena a temperatura normal,
- muestra una estabilidad aceptable (varios días en el caso de BLA) de su actividad residual después de procedimiento térmico.

Entrando en más detalle, la presente invención se explicará ahora por referencia al siguiente ejemplo.

Ejemplo 1 – dispositivo de seguimiento y método basado en una α -amilasa.

Para la estandarización del entorno enzimático, se requieren preferiblemente las dos etapas siguientes: (1) estandarización del entorno líquido de las enzimas y 2) estandarización de las concentraciones de estas enzimas en el entorno líquido. El entorno líquido estandarizado puede contener sacarosa y cloruro de sodio como estabilizantes ejemplares.

Mezclar la disolución enzimática estandarizada con una carga no porosa (por ejemplo, perlas de vidrio) da como resultado principalmente la adsorción de las enzimas en la superficie de la carga inerte. En caso de que se usen perlas de vidrio como carga, el volumen requerido de disolución enzimática estandarizada es el volumen exacto necesario para rellenar los espacios entre las perlas de vidrio.

A continuación se da un ejemplo cuando se usa una α -amilasa *Bacillus licheniformis* (BLA) y perlas de vidrio para la preparación de un ITT a base de enzimas:

- 1) tomar una muestra de disolución de α -amilasa *Bacillus licheniformis* (BLA),
- 2) determinar el contenido en proteínas (en mg/ml) de la muestra usando un Estuche BCÀ1 de determinación de Proteína Ácida Bicinchoninic comercialmente disponible en Sigma. Si es desconocido, determinar también el punto isoelectrico y el peso molecular por el uso de un método de isoenfoque y método SDS-PAGE respectivamente,
- 3) preparar un tampón que corresponda al punto isoelectrico de la enzima: para BLA, preparar 1.000 ml de un tampón bis-tris 0,005 M, pH = 6,9 a 25°C, mediante disolución de 1,046 g de una base bis-tris (M = 209,2) en aproximadamente 900 ml de agua destilada a 25°C, añadiendo después 2,56 g de cloruro de calcio deshidratado, 15,24 g de cloruro de sodio, 20 g de sacarosa y 1,27 g de cloruro de potasio; después valorar a pH 6,9 con HCl 0,1 N a 25°C y preparar finalmente un volumen hasta 1.000 ml con agua destilada.
- 4) sobre la base del contenido en proteína obtenido en la etapa (2), diluir una muestra de la disolución de BLA con el tampón para lograr una concentración de proteína de 1 mg/ml,
- 5) ultra-filtrar 9 ml de la disolución obtenida en la etapa (4) usando un dispositivo de centrifuga de 3.000, 10.000 ó 30.000 kD MACROSEP (comercialmente disponible en Pall Life Sciences, USA). La centrifugación se realiza en 2 etapas: (1) a 628 rad/s (6.000 rpm) durante 120 minutos a 4°C para ultra-filtración, después (2) a 628 rad/s (6.000 rpm) durante 1 minuto a 4°C para recuperar el producto de retención.
- 6) completar el producto de retención con el tampón preparado en la etapa (3) para obtener 5 veces el volumen de la disolución de BLA tomada inicialmente y contenida en los 9 ml ultra-filtrados en la etapa (5),
- 7) llenar copas Eppendorf de 1,5 ml con 1,35 g de perlas de vidrio de aproximadamente 0,25 mm de diámetro y añadir 0,281 ml de la disolución enzimática estandarizada obtenida en la etapa (6) (este volumen permite rellenar justo los espacios entre las perlas de vidrio).
- 8) sellar la punta de un capilar de vidrio con una llama y usar este capilar, una vez enfriado, para mezclar correctamente las perlas y la disolución obtenida en la etapa (6) para conseguir un color homogéneo pardo claro.

Después se consigue un fuerte nivel de deshidratación de la mezcla en dos etapas:

- liofilizar permite retirar la mayoría del agua contenida en la mezcla, después
- extra-deshidratación de la mezcla por evaporación secando en estufa a una temperatura muy por encima de la temperatura ambiente hasta peso constante (control con un equilibrio que muestra una sensibilidad de 0,01 mg).

Por ejemplo, el procedimiento de deshidratación aplicado a la mezcla conseguida en la etapa (8) puede ser como sigue:

- 9) deshidratar por liofilización el contenido de las copas Eppendorf (por ejemplo, por uso de un liofilizador Christ (Suiza)) con los siguientes parámetros de liofilización: calentamiento a la presión de seguridad de 1.000 Pa (10 mbar), presión de secado principal 18 Pa (0,180 mbar), condensador de hielo a -82°C, temperatura del descenso durante el secado principal a +4°C, tiempo de liofilización 20 horas; esta etapa permite retirar el agua entre las perlas en condiciones de no desnaturalización. Aunque se elimina el agua por sublimación, la enzima, los iones de cloruro de calcio, cloruro de potasio y cloruro de sodio y sacarosa se acumulan en la superficie de las perlas de vidrio. El final de la liofilización, estos compuestos recubren las perlas y actúan como un débil cemento entre ellas. Después de liberación del vacío, se obtiene una red tridimensional hecha de perlas de vidrio, enzima, sales, sacarosa y aire;
 - 10) recuperar el contenido de las copas Eppendorf, que consiste en un bloque sólido debido a proteínas, azúcares y sales, actúan como cemento entre las perlas. Con ayuda de una espátula de acero inoxidable, se obtiene un polvo homogéneo. Este polvo (una "mezcla") se hace de perlas cuya superficie se recubre mediante una capa delgada de enzimas y estabilizantes (sacarosa y cloruros de metal),
 - 11) mezclar de manera eficaz el contenido de las copas Eppendorf juntas en el interior de un tubo de plástico para lograr una mezcla homogénea y poner lo último en el interior de copas Eppendorf limpias;
 - 12) almacenar las copas Eppendorf que contienen la mezcla homogénea en el interior de un desecador que contiene P₂O₅;
 - 13) equipar a las tapaderas de los recipientes con anillos en O (Perkin-Elmer, estuche 0319-0029); ponerlas en una placa de vidrio con la cara del anillo en O visible; dejar secar el conjunto a 102°C durante 15 minutos en una estufa; después retirar la placa que contiene las tapaderas de la estufa y esperar a que se enfríe; una vez que se logra enfriar, dar la vuelta a cada tapadera (cara del anillo en O no visible);
 - 14) llenar los recipientes de Cápsulas de Gran Volumen de 60 µl (Perkin-Elmer, estuche 0319-0029) con 40 a 60 mg de la mezcla deshidratada (esta etapa se debería realizar extremadamente rápido, por ejemplo usando una espátula);
 - 15) además deshidratar la mezcla liofilizada poniendo los recipientes llenos a 102°C durante 1 hora en el interior de una estufa (obsérvese que esto ocurre sin inactivación de la enzima.
- Después se efectúa la encapsulación de la mezcla deshidratada en un envase pequeño y herméticamente cerrado para evitar que la mezcla deshidratada absorba humedad atmosférica. Por ejemplo, el procedimiento de encapsulación aplicado a la mezcla deshidratada en la etapa (15) se describe a continuación:
- 16) después de 1 hora de secado, retirar los recipientes de la estufa uno a uno y sellar rápidamente (es decir, dentro de menos de 10 segundos) las tapaderas sobre ellos según las recomendaciones de Perkin-Elmer; cerrar la puerta de la estufa entre cada sellado;
 - 17) dejar enfriar las cápsulas que contienen la mezcla a temperatura normal y almacenar el conjunto en el interior de un desecador que contiene P₂O₅;
 - 18) incluir las cápsulas, conteniendo la mezcla homogénea seca, en el interior de elastómero de silicona Sylgard 184 (comercialmente disponible en Dow Corning Chemical, Bélgica) según el procedimiento siguiente:
 - disponer las cápsulas en filas en una placa de vidrio de tal manera que cada fila esté separada de otra fila por una distancia de 0,5 cm como mínimo (la tapadera de las cápsulas tiene que estar en contacto con la placa),
 - preparar silicona Sylgard 184 siguiendo las recomendaciones de Dow Corning Chemical (10 partes de la Parte A con 1 parte de B (agente de curado),

- verter la silicona líquida en la placa que contiene las cápsulas hasta cubrir las cápsulas con 1 mm de silicona,
- dejar secar a 102°C en el interior de una estufa durante 20 minutos,
- recuperar la placa con las cápsulas y el silicio solidificado y dejar enfriar a temperatura normal,
- con una cortadora, cortar silicona alrededor de cada cápsula para obtener un trozo cuadrado de silicona (1 cm de lado) que contiene la cápsula,
- volver cada trozo de silicona que contiene una cápsula y con ayuda de un pequeño capilar de vidrio, añadir una capa delgada (0,5 mm) de silicona líquida en la cara de la cápsula no protegida por silicona.
- secar a 102°C en una estufa durante 15 minutos y
- recuperar los trozos de silicona que contienen las cápsulas y retirar las esquinas de silicona con una cortadora para obtener una forma octogonal (también se puede usar un sacabocados pequeño).

Se pueden determinar primero los parámetros cinéticos de inactivación por calor ITT (valores D y valor z) en condiciones isotérmicas haciendo uso del método de regresión en dos etapas clásico como sigue. En condiciones isotérmicas, se puede escribir una reacción de primer orden como ecuación (1):

$$\ln \frac{X}{X_0} = -k \cdot t \quad (1)$$

en la que:

- X_0 es el valor de la respuesta inicial (por ejemplo, una actividad enzimática inicial A_0),
- X es el valor de la respuesta después de tratamiento por calentamiento (por ejemplo actividad enzimática residual A),
- T es el tiempo de exposición (expresado en minutos) y
- K es la constante de velocidad de inactivación (expresada en min^{-1})

o, en la terminología de tiempo de destrucción térmica, como ecuación (2):

$$\log \frac{X}{X_0} = -\frac{1}{D} \cdot t \quad (2)$$

en la que D es el tiempo de reducción decimal, es decir, el tiempo para una reducción logarítmica de la respuesta a una temperatura dada, (el valor D se puede calcular de la pendiente de la línea de regresión lineal de $\log (X/X_0)$ frente al tiempo).

Sobre la base de la ecuación (3) de Bigelow a continuación, la sensibilidad térmica del tiempo de reducción decimal, expresada por el valor z (°C), se puede estimar por regresión lineal de valores de $\log D$ frente a las correspondientes temperaturas:

$$D_{T_2} = D_{T_1} \cdot 10^{\left(\frac{T_1 - T_2}{z}\right)} \quad (3)$$

Según la bibliografía, cuando se determina la pendiente de una reacción de primer orden, se obtiene la mejor precisión poniendo los puntos experimentales en los dos límites del dominio experimental. En nuestro caso, para cada temperatura de exposición investigada, el límite experimental que corresponde al intervalo de tiempo entre tiempo 0 y el tiempo de exposición máxima que corresponde al límite de detección del método de lectura (en nuestro caso lectura de la actividad residual de la enzima). En base a nuestros experimentos, se demostró que las cinéticas de inactivación de BLA a bajo contenido en humedad seguían una cinética de primer orden. Por lo tanto, es posible usar sólo 2 tiempos de exposición (próximos a los límites del dominio experimental) por temperatura investigada (tiempo 0 excluido) para determinar los valores D a cada temperatura de exposición. La precisión también aumentó usando 4 puntos por combinación tiempo-temperatura. El calentamiento isotérmico de la muestra se realizó sumergiendo simultáneamente diversos ITT en el interior de un baño de aceite (Grant, Inglaterra) con aceite de

silicona de Fluka (ref. 85.415). El enfriamiento se realizó en hielo-agua a 0°C.

Las Tablas 1 y 2 a continuación muestran los valores D y valores z y su error de regresión estándar asociado (determinado por regresión lineal) respectivamente para un ITT preparado con una mezcla basada en BLA y un ITT preparado con una mezcla basada en amilasa *Bacillus subtilis* (de ahora en adelante referida como BSA).

La actividad residual de las enzimas usadas para preparar el ITT se usa después como propiedad de respuesta. Por ejemplo, cuando se usa un ITT basado en BLA, la actividad de la α -amilasa se mide por medio de un fotospectrómetro UV-visible (comercialmente disponible en Pharmacia con el nombre comercial LKB Biochrom 4060) a 30°C usando un estuche Cat. N° TR 25421 (fabricado por Thermo Trace Ltd., Melbourne, Australia), es decir, basado en la liberación final de p-nitrofenol, que absorbe de manera máxima a 405 nm.

La actividad se expresa en términos del cambio de densidad óptica por minuto, calculado por regresión lineal a partir de una representación gráfica de la absorción frente al tiempo de reacción entre 2 y 4 minutos. Se usó una temperatura de 30°C para realizar el ensayo de actividad. Debido a que se usa actividad residual como propiedad de respuesta, es necesaria una manera rápida y eficaz para poner la enzima de la mezcla en la disolución. Se usó el siguiente método:

- 1) disponer el mismo número de copas Eppendorf que de cápsulas para leer en una rejilla y numerar cada uno de ellas con un marcador,
- 2) poner una copa Eppendorf de 1,5 ml vacía con cierre de seguridad en la placa de una balanza de precisión con una sensibilidad de 0,0001 g,
- 3) abrir una cápsula por doble compresión lateral en menos de 10 segundos,
- 4) recoger algo de mezcla del recipiente de la cápsula en el interior de la copa Eppendorf, cerrar la última y ponerla en la balanza; el valor indicado por la balanza corresponde a la cantidad de mezcla y debería estar preferiblemente entre aproximadamente 15 mg y 60 mg, después volver a realizar la etapa (2) a (4) para cada cápsula,
- 5) solubilizar la enzima como sigue:
 - añadir 1 ml de agua destilada en la copa Eppendorf que contenía una cantidad de mezcla de la cápsula,
 - cerrar la copa Eppendorf,
 - mezclar la copa Eppendorf radialmente con ayuda de una agitadora vorticial (a 209 rad/s (2.000 rpm) durante 30 segundos,
 - mezclar la copa Eppendorf axialmente con destreza durante 30 segundos (rotación extremo sobre extremo),
 - usar una pipeta, transferir 1 ml de Reactivo Amilasa y 0,020 ml de la disolución contenida en la copa Eppendorf en una cubeta: mezclar inmediatamente por inversión e incubar a la temperatura deseada durante 2 minutos,
 - determinar la pendiente de la curva de absorbancia frente al tiempo entre 2 y 4 minutos y repetir la etapa (5) para cada cápsula;
- 6) de cada pendiente, deducir una actividad A residual en Unidades/litro siguiendo las recomendaciones del fabricante del estuche. Si la actividad residual observada es mayor que 2.000 unidades/litro, diluir la disolución enzimática de la copa Eppendorf para obtener una actividad menor y repetir la medición;
- 7) usar la actividad A residual observada y la actividad A_0 inicial que corresponde a la misma cantidad de una mezcla no calentada de una cápsula no calentada y el valor $D_{121,1^\circ\text{C}}$ del ITT, calcular el valor F_{ITT} del procedimiento usando la ecuación clásica en la técnica.

Puesto que las condiciones del tratamiento térmico real implican condiciones de temperatura de estado no estacionario, era necesario evaluar la realización del sistema ITT de la invención en condiciones de temperatura variable.

Se generaron diversos perfiles no isotérmicos poniendo el ITT en el interior de esferas de silicio de 2,5 cm de diámetro (Dow Corning Sylgard 184 Silicone Elastomer, Bélgica). Se prepararon termopares usando cables de cobre - constantan (Omega, Bélgica) y conectores Ellab y se conectaron a un sistema de adquisición de datos CMC-92

(TR9216, Ellab, Dinamarca). Se obtuvo una precisión de 0,1°C con cada termopar por comparación con un sensor de temperatura de cuarzo de referencia (Testo, Bélgica). Se pusieron esferas simultáneamente en un baño de aceite (Grant, Inglaterra) a 123,2°C y se inició el registro tiempo-temperatura en el momento de la inmersión. Los valores del procedimiento Ft-T que corresponden a cada esfera se calcularon usando una etapa de tiempo de registro de 15 segundos, una temperatura de referencia de 121,1°C y un valor z igual al valor z del ITT obtenido en condiciones isotérmicas. Se realizó enfriamiento por inmersión en agua a 0°C para obtener valores de un procedimiento en el intervalo de 3 a 60 minutos. Los valores F del procedimiento conseguidos con el ITT se representaron gráficamente frente a los valores del procedimiento conseguidos por el método físico-matemático, para validar la capacidad del sistema enzimático para integrar convenientemente el tiempo y la temperatura en condiciones dinámicas.

Sobre la base de los resultados obtenidos, un error del porcentaje absoluto en el valor del procedimiento real por el ITT se determina según la ecuación (4) a continuación:

$$|\% \text{ error}| = \left| \frac{F_{t-T} - F_{ITT}}{F_{t-T}} \right| \times 100 \quad (4)$$

Un objetivo de la presente invención es poner a disposición de la industria alimentaria y de piensos una herramienta eficaz, económica, para seguir los impactos del proceso térmico sobre un atributo objetivo dado de un producto dado. En el caso de que el atributo objetivo en estudio mostrara un valor z diferente del del ITT obtenido siguiendo la preparación del ITT descrita anteriormente, es obvio que las desviaciones entre el valor del procedimiento deducido de la respuesta del ITT y el valor del procedimiento real sobre el atributo objetivo en estudio pueden llegar a ser más o menos importantes dependiendo de la historia de temperatura real en el interior del producto durante el tratamiento térmico. Esta historia de temperatura variará dependiendo de las características térmicas del producto (parámetros de penetración del calor) y de las características del procedimiento (tiempo de fijación, temperatura de fijación, tiempo *come-up*, tiempo *come-down*). Se pueden usar entonces dos métodos diferentes para calcular un factor de corrección para aplicar al valor del procedimiento procedente de la respuesta del ITT:

- un primer método, referente a un ITT de un solo componente que muestra un valor z diferente del del atributo objetivo de interés, consiste en integrar el perfil tiempo-temperatura (medido o simulado con un modelo de transferencia de calor de diferencia finita en cilindro infinito) experimentado por el producto con el valor z del atributo objetivo en estudio y el valor z del ITT que se esté tratando. La diferencia en valores de procedimiento correspondientes $z_{\text{Target}} F_{T_{\text{ref}}}$ y $z_{\text{ITT}} F_{T_{\text{ref}}}$ corresponde a un factor de corrección para aplicar a cualquier respuesta ITT para el producto y el procedimiento en consideración;
- un segundo método está relacionado con el uso de un ITT multi-componente basado en una mezcla que contiene al menos dos enzimas diferentes; el concepto de ITT multi-componente se describe en la bibliografía.

La Tabla 3 muestra parámetros cinéticos conseguidos cuando se usa el ITT basándose en una mezcla altamente deshidratada preparada con BLA, así como el porcentaje absoluto de error (a valores de z de 10 a 13,3°C) en condiciones isotérmicas. Cualquiera que sea el conjunto de parámetros cinéticos usado, este ITT permite la medida de valores del procedimiento en el intervalo de 0 a 60 minutos.

Como biosensores o biointegradores, el ITT preparado según el procedimiento descrito anteriormente debe ser sensible al tiempo de almacenaje y a las condiciones o entre preparación y uso o entre calentamiento y lectura de la respuesta. También se investiga por lo tanto, la influencia del tiempo de almacenaje en condiciones atmosféricas a temperatura normal (15 a 25°C).

La Tabla 4 muestra la evolución de la respuesta del ITT frente al tiempo de almacenaje a temperatura normal y en condiciones atmosféricas. Los valores corresponden a un ITT basado en BLA. Se indican los valores del procedimiento procedentes de un ITT sometido simultáneamente a los mismos tratamientos térmicos y lectura después de ciertos tiempos de almacenaje hasta 6 días. La actividad enzimática inicial usada para realizar cálculos es la actividad inicial deducida de un promedio de 3 ITT no calentados el día 0.

La estabilidad (menos del 8% de descomposición) del valor del procedimiento procedente del ITT de la invención se puede observar hasta 6 días después de tratamiento con calor. Debido a la etapa de liofilización y la etapa de secado (102°C en una estufa) incluidas en el procedimiento de preparación del ITT, la última está totalmente deshidratada y se observó que mostraba una buena estabilidad durante varios meses. Los parámetros de inactivación por calor (valores D y valores z) fueron constantes durante varios meses.

Tabla 1

Parámetros de la cinética de inactivación por calor		
Temperatura (°C)	Valores D (minutos)	Valor Z (°C)
114,9	154	13,3
120,9	47,4	
124,7	26	
127,2	18,8	

Tabla 2

Parámetros de la cinética de inactivación por calor		
Temperatura (°C)	Valores D (minutos)	Valor Z (°C)
121,1	54	16,1
124,9	32,6	
128,1	19,7	

5

Tabla 3

Tipo de regresión	Parámetros cinéticos D _{121,1°C} (minutos) Z (°C)	F _{ITT} /F _{t-T} (Z _{ITT} = 13,3°C) % error absoluto	F _{ITT} /F _{t-T} (z=10°C) % error absoluto
Lineal	45,8 minutos 13,3 °C	13,45	13,47

Tabla 4

F _{ITT} - almacenaje time	Tratamientos por calor			D _{121,1°C} - valor* (min)	valor Z (°C)
	A: 60 min. a 115,8°C	B: 40 min. " a 121,1 °C	C: 15 min. a 124,9°C		
F _{ITT} -Día 0	22,2	40,0	28,5	78,7	12,9
F _{ITT} -Día 1	21,2	39,7	24,9	79,4	13,5
F _{ITT} -Día 3	21,0	39,9	23,9	78,7	13,9
F _{ITT} -Día 6	20,6	38,5	26,6	82,0	12,8

Ejemplo 2 – dispositivo de seguimiento y método basado en una pectino-metil esterasa.

10 Cuando se aplica el procedimiento de preparación del ITT descrito anteriormente del ejemplo 1 a una pectino-metil esterasa de pepino purificada, la curva de inactivación obtenida a 102°C permite calcular un valor D a 65,8 minutos a 102°C. Aunque sólo se investigó una exposición a temperatura (es decir, no se determinó valor z), esto dio como resultado que (i) es posible aumentar enormemente la estabilidad térmica de una enzima relacionada con una planta

15 tal como pectino-metil esterasa de pepino hasta temperaturas mayores que 100°C y (ii) por lo tanto, se hace posible

usar este método de preparación para preparar un ITT útil para procedimientos de pasteurización a alta temperatura (es decir, dentro de un intervalo de aproximadamente 90 a 110°C).

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de seguimiento a base de enzimas para seguir el impacto térmico de un tratamiento térmico en un objeto dentro de un intervalo de temperatura de 80°C a 160°C, comprendiendo dicho dispositivo un envase que

- dicho envase es un envase herméticamente cerrado y

- dicho envase encierra una mezcla deshidratada sólida que comprende al menos dicha enzima y al menos una primera carga, en el que el contenido en agua de dicha mezcla deshidratada está por debajo de 0,6 en peso, cierre hermético del envase herméticamente cerrado que se obtiene mediante al menos dicha barrera para evitar la entrada de humedad en dicho envase.

2. Un dispositivo de seguimiento a base de enzimas según la reivindicación 1, en el que al menos dicha enzima representa entre 0,001 y 10% en peso, de la mezcla deshidratada sólida encerrada en dicho envase herméticamente cerrado y en el que al menos dicha primera carga representa entre 90 y 99,999% en peso de la mezcla deshidratada sólida encerrada en dicho envase herméticamente cerrado.

3. Un dispositivo de seguimiento a base de enzimas según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que al menos dicha primera carga es una carga no porosa.

4. Un dispositivo de seguimiento a base de enzimas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que al menos dicha primera carga es una carga inorgánica o una carga orgánica.

5. Un dispositivo de seguimiento a base de enzimas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha mezcla deshidratada sólida comprende además al menos una segunda carga que representa hasta 10% en peso de la mezcla deshidratada sólida encerrada en dicho envase herméticamente cerrado.

6. Un dispositivo de seguimiento a base de enzimas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que al menos dicha enzima es de origen bacteriano, vegetal, animal o fúngico y en el que la cantidad de al menos dicha enzima en dicho dispositivo está por debajo de aproximadamente 3 mg.

7. Un dispositivo de seguimiento a base de enzimas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho envase herméticamente cerrado se fabrica de uno o más materiales impermeables a la humedad seleccionados del grupo que consiste en vidrio, sílice, metales y polímeros.

8. Un método para seguimiento del impacto térmico del tratamiento térmico en un objeto mediante un dispositivo de seguimiento a base de enzimas, comprendiendo dicho dispositivo un envase que contiene al menos una enzima y al menos una barrera, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) poner dicho dispositivo de seguimiento a base de enzimas en contacto con dicho objeto o en las proximidades de dicho objeto;

(b) exponer dicho objeto y dicho dispositivo de seguimiento a base de enzimas a tratamiento térmico a una temperatura dentro de un intervalo de 80°C a 160°C durante tiempo suficiente para degradar una porción sustancial de al menos dicha enzima sin romper al menos dicha barrera de dicho envase;

(c) retirar dicho envase del contacto con dicho objeto o de las proximidades de dicho objeto después de la terminación de la etapa (b);

caracterizado por que:

- dicho envase es un envase herméticamente cerrado,

- dicho envase encierra una mezcla deshidratada sólida que comprende al menos dicha enzima y al menos una primera carga, en el que el contenido en agua de dicha mezcla deshidratada está por debajo de 0,6% en peso, cierre hermético del envase cerrado herméticamente que se obtiene mediante al menos dicha barrera para evitar la entrada de humedad en dicho envase durante el tratamiento térmico de dicho objeto y

- dicho método comprende además las etapas de:

(d) abrir dicho envase herméticamente cerrado y obtener una muestra de al menos una enzima de dicho envase herméticamente cerrado;

(e) medir la actividad residual de al menos dicha enzima en la muestra obtenida y

- (f) usar la actividad residual medida como un medio para cuantificar el impacto térmico del tratamiento térmico de la etapa (b) en uno o más atributos objetivo dados de dicho objeto.

5 9. Un método de seguimiento del impacto térmico del tratamiento térmico en un objeto según la reivindicación 8, caracterizado por que:

10 - en la etapa (d), se obtiene una muestra de al menos dicha enzima encerrada en dicho envase herméticamente cerrado en la forma de una disolución enzimática por solubilización en o más disolventes de la fracción de dicha mezcla deshidratada sólida que comprende al menos dicha enzima y

15 - en la etapa (e), se pone en contacto dicha disolución enzimática con un sustrato para al menos dicha enzima, dando como resultado un producto, y se efectúa la medición de la actividad residual de al menos dicha enzima por cuantificación de la velocidad de formación de dicho producto.

10. Un método de seguimiento del impacto térmico del tratamiento térmico en un objeto según la reivindicación 9, en el que dicho atributo objetivo dado de dicho objeto que se cuantifica en la etapa (f) es una propiedad química, física, organoléptica o microbiológica de dicho objeto.

20 11. Un método de seguimiento del impacto térmico del tratamiento térmico en un objeto según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicho objeto se selecciona del grupo que consiste en alimento para seres humanos o animales y herramientas o dispositivos médicos.

25 12. Un método de seguimiento del impacto térmico del tratamiento térmico en un objeto según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicho objeto es una composición farmacéutica en forma de un líquido, jarabe, crema o pasta.

30 13. Un método de seguimiento del impacto térmico del tratamiento térmico en un objeto según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que al menos dicha enzima representa entre 0,001 y 10% en peso de dicha mezcla deshidratada sólida.