

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 441**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/02 (2006.01)
C12Q 1/48 (2006.01)
G01K 3/04 (2006.01)
G01N 33/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04787169 .4**
96 Fecha de presentación: **17.09.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1664334**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para determinar si un producto está o no en condiciones de ser utilizado o consumido**

30 Prioridad:
17.09.2003 FR 0350556
03.02.2004 FR 0450200

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.08.2012

73 Titular/es:
CRYOLOG S.A.
1 PLACE PAUL VERLAINE
92100 BOULOGNE, FR

72 Inventor/es:
LOUVET, Olivier;
THUAULT, Dominique y
VAILLANT, Renaud

74 Agente/Representante:
de 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).

ES 2 386 441 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y dispositivo para determinar si un producto está o no en condiciones de ser utilizado o consumido.

La presente invención se refiere a un procedimiento y a un indicador para determinar si un producto, destinado a ser conservado en condiciones de temperatura y durante un período de tiempo que limite su degradación, está o no en condiciones de ser utilizado o consumido.

En la solicitud de patente internacional publicada bajo el número W003/025529 se ha descrito un procedimiento para controlar de manera sistemática y automática un producto cuya conservación en un circuito de distribución depende de la temperatura, especialmente un producto sometido a una cadena de frío.

En el procedimiento descrito en esa solicitud anterior está previsto un marcador que cambia de estado cuando la temperatura del producto supera un umbral de temperatura determinado, o cuando las condiciones de conservación se desvían de un nivel de referencia determinado, siendo esas condiciones la superación de un umbral de temperatura determinado durante un período de tiempo superior al período de tiempo determinado o la superación de un período de tiempo de conservación determinado.

En otras palabras, la técnica descrita en ese documento anterior prevé indicaciones que son función de la superación de umbrales o límites de tiempo o de temperatura determinados.

Se conoce igualmente la técnica descrita en la solicitud EP-A1-0497459 que se refiere a un dispositivo que permite informar al consumidor sobre eventuales superaciones del período de consumo o de la temperatura de almacenamiento de un producto, siendo esas variaciones susceptibles de alterar la calidad del producto alimentario. Este dispositivo se basa en la utilización de un indicador que puede comprender microorganismos acidificantes. El cambio de pH provoca entonces un cambio de color del indicador, advirtiendo al consumidor de un cambio de temperatura y de una alteración de la calidad del producto.

Los productos termosensibles, y especialmente los productos alimentarios, son productos que evolucionan de manera continua en función del par tiempo/temperatura. La existencia de una temperatura de conservación es sólo una recomendación que permite garantizar un período de tiempo de utilización del producto.

Es el caso especialmente de los productos alimentarios frescos.

De hecho, las normas, particularmente las relativas a los productos alimentarios, imponen una fecha límite de consumo o de utilización que depende de las condiciones de temperatura y de tiempo de conservación. Por ejemplo, para un producto alimentario que debe conservarse entre 0°C y +4°C, la fecha límite de consumo determinada por las autoridades comprende la exposición del producto, durante un período más o menos prolongado, a una temperatura superior (+8°C) que corresponde a una ruptura de la cadena de frío razonable (norma AFNOR NF V 01-003).

La invención parte de la constatación de que las fechas límite de utilización no son en general óptimas porque se determinan en condiciones de conservación supuestas. Por ejemplo, para un producto perecedero que debe conservarse entre 0°C y +4°C, su período de tiempo de utilización puede extenderse en relación al que indica la norma si el producto no es expuesto a temperaturas superiores a +4°C, en la medida en que dicha norma prevé una exposición a una temperatura de ruptura de la cadena de frío de +8°C. Esto significa que ciertos productos no se consumen aunque podrían consumirse, lo cual constituye un inconveniente importante tanto en términos prácticos como económicos.

De este modo, en el procedimiento según la invención se asocia al producto perecedero un indicador que presenta características de evolución en función del tiempo y de la temperatura análogas a las características correspondientes del producto. Este indicador, debido a sus características, brinda información sobre la posibilidad de utilización o de consumo de un producto perecedero en función de la evolución de las condiciones de conservación del producto;

de manera que el indicador brinda información que permite que el producto pueda utilizarse o consumirse durante un período más prolongado si el producto fue conservado en mejores condiciones que las estándar,

y de manera que el indicador brinda información que permite que el producto pueda utilizarse o consumirse durante un período más corto si el producto fue conservado en peores condiciones que las estándar.

Así, con este procedimiento, la fecha límite de utilización o de consumo varía en función de las condiciones de temperatura y del período de tiempo de conservación reales del producto; la fecha límite de consumo (FLC) o la fecha límite de utilización óptima (FLUO) inscrita por el fabricante en el momento del envasado del producto perecedero se vuelve dinámica y evoluciona entonces en función de las condiciones reales del producto. Por ejemplo, para un producto alimentario el período de tiempo de conservación se reducirá si las condiciones de temperatura se degradan y, por el contrario, la fecha límite de consumo se prolongará si las condiciones de temperatura son mejores, tal como se ilustra en la Figura 15.

En esas condiciones, la fecha límite de consumo puede prolongarse considerablemente en relación con la prevista por las reglamentaciones. A título de ejemplo, un producto fresco con una fecha límite de consumo determinada puede ser congelado por el consumidor; una vez congelado, el producto podrá conservarse durante varias semanas e incluso varios meses y por lo tanto podrá consumirse mucho más allá de la fecha límite de consumo indicada en el producto perecedero, tal como se ilustra en la Figura 16. El procedimiento, tal como se describe, tiene en cuenta la degradación real del producto antes de la congelación, deja de evolucionar durante la fase de congelación y después de la descongelación indica que el producto puede consumirse, hasta la indicación de cambio de estado, información que el consumidor no dispone en la actualidad.

Supongamos que un consumidor compra un producto perecedero cuya fecha límite de consumo es de 7 días después de la fecha de envasado, en las condiciones normales de conservación. Supongamos que decide congelar el producto 2 días antes del vencimiento de la FLC. Puesto que la congelación a -18°C detiene la degradación microbiológica del producto, el consumidor puede decidir un mes más tarde descongelar su producto y consumirlo en los días siguientes. El consumidor no dispondrá entonces de ninguna información que le permita saber hasta cuándo puede consumir el producto perecedero. El procedimiento tal como se describe permite responder a esta problemática ya que tiene en cuenta la degradación real del producto antes, durante y después de la congelación. De este modo el consumidor dispondrá de un indicador que, ante la ausencia de cambio de estado, le confirmará que puede consumir el producto; y que le indicará, mediante un cambio de estado, que el producto no debe consumirse si lo conserva demasiado tiempo en el refrigerador después de la descongelación. Esto se ilustra en la Figura 13.

Además, se sabe que suele desaconsejarse vivamente volver a congelar un producto que acaba de ser descongelado, en especial debido al riesgo de desarrollo de las bacterias que estaban inicialmente presentes en el producto. Con la invención es igualmente posible controlar ese riesgo ya que el indicador presenta características de evolución, en función del tiempo y de la temperatura, análogas a las características correspondientes del producto. Así, el indicador seguirá la misma evolución que el producto perecedero y podrá volver a congelarse, integrando entonces el cambio de estado del indicador el conjunto de los períodos durante los cuales el producto está expuesto a temperaturas que provocan su degradación.

Sin embargo, la invención no se limita a los productos alimentarios. Otros productos, como los medicamentos, las vacunas y la sangre para transfusiones, deben conservarse dentro de intervalos predeterminados de temperaturas y el hecho de salirse del intervalo (por el límite superior o por el límite inferior) podrá conducir a adelantar la fecha límite de utilización. Asimismo, si el producto se conserva en condiciones óptimas, la fecha límite de utilización podrá prolongarse.

De manera general, si el producto, aunque deba conservarse dentro de un intervalo determinado de temperaturas, presenta una temperatura óptima de conservación, entonces la fecha límite de consumo o de utilización se aplazará tanto como se aproxime a esa temperatura óptima.

Debe señalarse que en relación con las técnicas anteriores conocidas, especialmente las relativas a la conservación de los productos alimentarios, la invención no se limita al hecho de que el indicador resulte útil cuando la temperatura de conservación del producto supere un límite, sino que se aplica en las condiciones normales de conservación del producto. Por lo tanto, la invención es más que un simple indicador de ruptura de la cadena de frío o que un simple indicador de superación de umbral. Más bien es una verdadera fecha límite de consumo dinámica, o fecha límite de utilización dinámica, de un producto perecedero.

De preferencia, se ofrece un indicador que contiene una sustancia microbiana, especialmente cuando el producto perecedero en cuestión es un alimento o un producto biológico.

En una realización, se ofrece un indicador con una sustancia microbiana que genera un ácido y se mide la actividad de esta sustancia microbiana siguiendo la evolución del pH del medio, en general una acidificación; de manera que, mientras el pH no desciende por debajo de un valor predeterminado, el indicador señala que el producto puede consumirse; y de manera que, cuando el pH desciende por debajo de un valor predeterminado, el indicador señala que el producto no puede consumirse.

En ese caso, para seguir la evolución del pH en el indicador, al medio que contiene la sustancia microbiana se añade, por ejemplo, caseína, que forma un precipitado cuando el pH desciende por debajo del valor determinado, lo cual modifica el aspecto del medio.

De este modo, la invención se refiere a un procedimiento para determinar si un producto es apto o no para ser utilizado o consumido, estando dicho producto destinado a ser conservado en condiciones de temperatura y durante un período de tiempo que limiten su degradación, procedimiento en el cual se asocia al producto un indicador que suministra una señal que indica la posibilidad de utilización o de consumo del producto; luego, después del vencimiento de un período de tiempo de conservación, suministra una señal que indica un cambio de estado de la posibilidad de utilización o de consumo del producto, variando este período de tiempo en función de las condiciones de conservación del producto,

de manera que el indicador suministra una información que permite que el producto sea apto para ser utilizado o consumido durante un período de tiempo más importante si se ha conservado en mejores condiciones que las condiciones estándar o recomendadas, o durante un período de tiempo menos importante si el producto se ha conservado en peores condiciones que las condiciones estándar o recomendadas,

- 5 el indicador contiene al menos una sustancia microbiana con una actividad acidificante que hace variar el pH del medio en el cual se encuentra,

dicha sustancia microbiana contiene al menos una cepa de bacterias seleccionada entre:

- la cepa CRYO-CB001 de la especie *Carnobacterium piscicola* registrada en la CNCM (Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos, París, Francia) bajo el N° CNCM I-3297, el 16 de septiembre de 2004; y

- 10 - la cepa CRYO-CB002 de la especie *Carnobacterium piscicola* registrada en la CNCM (Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos, París, Francia) bajo el N° CNCM I-3298, el 16 de septiembre de 2004;

y en la cual se genera, con la ayuda de un revelador, la señal que indica el cambio de estado cuando el pH del medio en el cual se encuentra la sustancia microbiana desciende por debajo de un valor determinado.

En una realización, el revelador forma un precipitado cuando el pH desciende por debajo del valor predeterminado.

- 15 Ese revelador incluye, por ejemplo, caseína.

En una realización, el revelador incluye al menos un indicador coloreado.

- El indicador coloreado se selecciona, por ejemplo, en el grupo siguiente: alizarina, sulfonato sódico de alizarina, rojo de alizarina, benzopurpurina, benzoil auramina G, benzoiletilauramina, azul de resorcina, azul de bromoclorofenol, verde de bromocresol, azul de bromofenol, ácido carmínico, 2,4-dinitrofenol, ácido 4-(4-dimetilamino-1-naftilazo)-3-metoxibencenosulfónico, α -dinitrofenol, β -dinitrofenol, γ -dinitrofenol, 4,4-Bis (O-toliltriaceño)2,2'-estilbenodisulfonato disódico, 4,4-Bis(P-dimetilaminofenilazo)-2,2'-estilbenodisulfonato disódico, monohidrocloreto de 4-(P-etoxifenilazo)-M-fenileno-diamina, rojo de etilo, naranja de etilo, Rojo de hexametoxi, hidroquinolsulfonaftaleína, lacmoide, iodesina, lasmoide, N,N-dimetil-P-(M-tolilazo)Anilina, 4'-metoxi-2,4-diaminoazobenceno, rojo de metilo, rojo de metilo-alfazurina, α -naftilamina, α -naftilaminoazo-benceno, rojo de naftilo, azul de oxima, 4'-oxi-3'-metil-2,4-diaminoazobenceno, 4'-oxi-2,4-diaminoazobenceno, 4-fenilazo-1-naftilamina, parafulcina-ácido hexa-acético, paranitrofenol, P-etoxicrisoidina, P-sulfo-O-metoxibencenoazodimetil- α Naftilamina, rojo congo, rojo violeta, resazurina, rojo de naftilo, tetrabromocresol, tetraiodofenolsulfotaleína, ácido aurina, ditiozona, azul de cromo, púrpura de bromocresol, índigo carmín, cacetelina, calceína, eosina extra, eriocromocianina, amarillo de tiazol, negro de eriocromo T, α -nitro β -naftol, naranja III, rojo de metilo, rodamina B, rodazonato de potasio, timolsulfoneftaleína, cloruro de rodio, trihidroxil2,6,7fenil9 isoxanteno, thorin (torón), sal tetrasódica de naranja de xileno, antocianos, fenoltaleína, benzopurpurina 4B, benzopurpurina B, hidrocloreto de rojo de alfa-naftilo, tornasol, rojo de metilo, indicador mixto, lacmoide (azul de resorcinol).
- 20
- 25
- 30

En una realización, para adaptar el indicador al producto se selecciona al menos uno de los parámetros incluidos en el grupo siguiente: la naturaleza de la sustancia microbiana, la cantidad de esta sustancia microbiana, la naturaleza de los nutrientes, la cantidad de los nutrientes, la naturaleza de los elementos necesarios para la producción de ácido por la sustancia microbiana y la cantidad de esos elementos, la naturaleza de un texturizante del medio en el cual se encuentra la sustancia microbiana y la cantidad de ese texturizante, el pH inicial del medio, los parámetros que inciden en la actividad del agua (a_w) del medio, la naturaleza del revelador utilizado para medir el descenso del pH y la cantidad de ese revelador y los parámetros que determinan el pH al cual ese revelador cambia de estado.

35

- 40 Los parámetros se eligen, por ejemplo, para que la señal que señala el cambio de estado aparezca al final de un período de tiempo predeterminado cuando el producto se conserva en las condiciones estándar o recomendadas.

Los parámetros pueden elegirse para que la señal que indica el cambio de estado aparezca cuando el producto deja de ser apto para el consumo.

- En una realización, en las condiciones estándar o recomendadas, se eligen los parámetros del indicador para que la señal que señala el cambio de estado aparezca después de un período de tiempo determinado, aumentándose este período de tiempo mediante la modificación de uno de esos parámetros alejándolo de los valores óptimos para la acidificación por la sustancia microbiana.
- 45

En una realización, los nutrientes incluyen una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, y, de preferencia, sales minerales y/o vitaminas y/u oligoelementos.

- La fuente de carbono se elige por ejemplo entre los azúcares del grupo siguiente: glicerol, eritritol, D-arabinosa, L-arabinosa, ribosa, D-xilosa, L-xilosa, adonitol, β metilxilósido, galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, L-sorbosa, Ramnosa, dulcitol, inositol, manitol, sorbitol, α metil-D-manósido, α metil-D-glucósido, N acetilglucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, lactosa, melibiosa, sacarosa, trehalosa, inulina, melecitosa, D-rafinosa, almidón, glucógeno, xilitol, β gentibiosa, D-turanosa, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, gluconato, 2 cetogluconato, 5 cetogluconato.
- 50

El texturizante se elige, por ejemplo, entre los del grupo siguiente: agar, agarosa, gelatina, xantano, escleroglucano, Gum Guar.

En una realización, el indicador se halla desactivado cuando no está asociado al producto y activado cuando está asociado al producto.

- 5 La desactivación se realiza por ejemplo con la ayuda de medios elegidos en el grupo siguiente: congelación, microencapsulación de la sustancia microbiana y/o de los nutrientes, compartimentación.

En una realización, la activación del indicador se realiza mediante una acción física elegida en el grupo siguiente: variación de presión, variación de temperatura y variación de la longitud de onda de exposición a una radiación.

En una realización, la sustancia microbiana puede congelarse o descongelarse.

- 10 La invención se refiere también a la aplicación del procedimiento definido en párrafos anteriores a productos de tipo alimentario, biológico o farmacéutico.

La invención se refiere igualmente a la aplicación del procedimiento definido en párrafos anteriores a productos alimentarios en los que el indicador está parametrizado para que la aparición de la señal que indica un cambio de estado se retrase en la medida en que la temperatura de conservación del producto se acerca a la temperatura óptima de conservación.

- 15 La invención se refiere también a la aplicación del procedimiento definido en párrafos anteriores a un producto alimentario destinado a ser conservado a temperaturas comprendidas entre 0°C y +4°C aproximadamente, y en el cual el indicador comprende una sustancia microbiana que tiene una actividad acidificante a temperaturas inferiores o iguales a +4°C aproximadamente.

La invención se refiere igualmente a un dispositivo para determinar si un producto se halla o no en condiciones de ser utilizado o consumido, estando dicho producto destinado a ser conservado en condiciones de temperatura y durante un período de tiempo que limite su degradación, comprendiendo este dispositivo al menos un indicador destinado a estar asociado al producto, siendo dicho indicador de naturaleza tal que señala la posibilidad de utilización o de consumo del producto, y luego, después del vencimiento del período de tiempo de conservación, una señal que indica un cambio de estado de la posibilidad de utilización o de consumo del producto, período de tiempo que evoluciona en función de las condiciones de conservación del producto,

- 20 La invención se refiere igualmente a un dispositivo para determinar si un producto se halla o no en condiciones de ser utilizado o consumido, estando dicho producto destinado a ser conservado en condiciones de temperatura y durante un período de tiempo que limite su degradación, comprendiendo este dispositivo al menos un indicador destinado a estar asociado al producto, siendo dicho indicador de naturaleza tal que señala la posibilidad de utilización o de consumo del producto, y luego, después del vencimiento del período de tiempo de conservación, una señal que indica un cambio de estado de la posibilidad de utilización o de consumo del producto, período de tiempo que evoluciona en función de las condiciones de conservación del producto,

de manera que el indicador suministra una información que permite que el producto pueda utilizarse o consumirse durante un período de tiempo más prolongado si el producto fue conservado en mejores condiciones que las condiciones estándar o recomendadas, o durante un período de tiempo más corto si el producto fue conservado en peores condiciones que las condiciones estándar o recomendadas,

- 30 o durante un período de tiempo menos prolongado si el producto fue conservado en peores condiciones que las condiciones estándar o recomendadas,

el indicador contiene al menos una sustancia microbiana que tiene una actividad acidificante que hace variar el pH del medio en el cual se encuentra;

- 35 dicha sustancia microbiana contiene al menos una cepa de bacterias seleccionada entre:

- la cepa CRYO-CB001 de la especie *Carnobacterium piscicola* registrada en la CNCM (Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos, París, Francia) bajo el N° CNCM I-3297, el 16 de septiembre de 2004; y

- la cepa CRYO-CB002 de la especie *Carnobacterium piscicola* registrada en la CNCM (Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos, París, Francia) bajo el N° CNCM I-3298, el 16 de septiembre de 2004;

- 40 dicho indicador contiene además un revelador y medios para suministrar una señal que indica el cambio de estado cuando el pH del medio en el cual se encuentra la sustancia microbiana desciende por debajo de un valor predeterminado.

El revelador es, por ejemplo, de tal naturaleza que forma un precipitado cuando el pH desciende por debajo del valor predeterminado.

- 45 En una realización, el revelador está compuesto por caseína.

En una realización, el revelador está compuesto al menos por un indicador coloreado.

En una realización, el indicador coloreado está comprendido en el grupo siguiente: alizarina, sulfonato sódico de alizarina, rojo de alizarina, benzopurpurina, benzoil auramina G, benzoiletillauramina, azul de resorcina, azul de bromoclorofenol, verde de bromocresol, azul de bromofenol, ácido carmínico, 2,4-dinitrofenol, ácido 4-(4-dimetilamino-1-naftilazo)-3-metoxibencenosulfónico, α -dinitrofenol, β -dinitrofenol, γ -dinitrofenol, 4,4-Bis (O-

- 50

tolitriaceno)2,2'-estilbenodisulfonato disódico, 4,4-Bis(P-dimetilaminofenilazo)-2,2'-estilbenodisulfonato disódico, monohidrocloreto de 4-(P-etoxifenilazo)-M-fenileno-diamina, rojo de etilo, naranja de etilo, Rojo de hexameto, hidroquinolsulfonaftaleína, lacmoide, iodesina, lasmoide, N,N-dimetil-P-(M-tolilazo)Anilina, 4'-metoxi-2,4-diaminoazobenceno, rojo de metilo, rojo de metilo-alfazurina, α -naftilamina, α -naftilaminoazo-benceno, rojo de naftilo, azul de oxima, 4'-oxi-3'-metil-2,4-diaminoazobenceno, 4'-oxi-2,4-diaminoazobenceno, 4-fenilazo-1-naftilamina, parafulsina-ácido hexa-acético, paranitrofenol, P-etoxicrisoidina, P-sulfo-O-metoxibencenoazodimetil- α Naftilamina, rojo congo, rojo violeta, resazurina, rojo de naftilo, tetrabromocresol, tetraiodofenolsulfotaleína, ácido aurina, ditiozona, azul de cromo, púrpura de bromocresol, índigo carmín, cacetelina, calceína, eosina extra, eriocromocianina, amarillo de tiazol, negro de eriocromo T, α -nitro β -naftol, naranja III, rojo de metilo, rodamina B, rodazonato de potasio, timolsulfoneftaleína, cloruro de rodio, trihidroxi2,6,7fenil9 isoxanteno, thorin (torón), sal tetrasódica de naranja de xileno, antocianos, fenoltaleína, benzopurpurina 4B, benzopurpurina B, hidrocloreto de rojo de alfa-naftilo, tornasol, rojo de metilo, indicador mixto, lacmoide (azul de resorcinol).

En una realización, al menos uno de los parámetros del indicador es de tal naturaleza que se adapta al producto, estando comprendidos los parámetros en el grupo siguiente: la naturaleza de la sustancia microbiana, la cantidad de esta sustancia microbiana, la naturaleza de los nutrientes, la cantidad de esos nutrientes, la naturaleza de los elementos necesarios para la producción de ácido por la sustancia microbiana y la cantidad de esos elementos, la naturaleza de un texturizante del medio en el cual se encuentra la sustancia microbiana y la cantidad de ese texturizante, el pH inicial del medio, los parámetros que inciden en la actividad del agua (aw) del medio, la naturaleza del revelador utilizado para medir el descenso del pH, y la cantidad de ese revelador, los parámetros que determinan el pH al cual ese revelador cambia de estado.

En una realización, el indicador es de tales características que los parámetros son de tal naturaleza que la señal que indica el cambio de estado aparece al cabo de un período de tiempo predeterminado cuando el producto se conserva en las condiciones estándar o recomendadas.

En una realización, el dispositivo comprende un indicador en el cual los parámetros tienen tales características que la señal que indica el cambio de estado aparece cuando el producto dejar de estar en condiciones de ser consumido o utilizado.

En una realización, los nutrientes incluyen una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno.

La fuente de carbono está comprendida, por ejemplo, entre los azúcares del grupo siguiente: glicerol, eritritol, D-arabinosa, L-arabinosa, ribosa, D-xilosa, L-xilosa, adonitol, metilxilósido, galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, L-sorbose, Ramnosa, dulcitol, inositol, manitol, sorbitol, α metil-D-manósido, α metil-D-glucósido, N acetilglucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, lactosa, melibiosa, sacarosa, trehalosa, inulina, melecitosa, D-rafinosa, almidón, glucógeno, xilitol, gentibiosa, D -turanosa, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, gluconato, 2 cetogluconato, 5 cetogluconato.

En una realización, el texturizante está comprendido entre los del grupo siguiente: agar, agarosa, gelatina, xantano, escleroglucano, Gum Guar.

En una realización, el indicador es de tal naturaleza que se halla inactivo cuando no está asociado al producto y activado cuando está asociado al producto.

En una realización, la desactivación se realiza con la ayuda de medios comprendidos en el grupo siguiente: congelación, microencapsulación de la sustancia microbiana y/o de los nutrientes, compartimentación.

En una realización, la activación del indicador se realiza mediante una acción física seleccionada en el grupo siguiente: variación de presión, variación de temperatura, variación de la longitud de onda de exposición a una radiación.

En una realización, la sustancia microbiana es congelable y descongelable.

En una realización, el indicador se presenta bajo la forma de una etiqueta, preferentemente autoadhesiva.

En una realización, el indicador comprende al menos una cara, una de cuyas zonas permite observar la señal producida por el revelador.

En una realización, la etiqueta comprende varios compartimentos internos, por ejemplo cápsulas, que permiten separar uno o varios elementos constitutivos del componente de los otros durante un período de tiempo determinado, pudiendo romperse las paredes de dichos compartimentos mediante cualquier medio apto, por ejemplo mediante presión sobre la etiqueta.

Otras características y ventajas de la presente invención aparecerán en la lectura de la descripción de diferentes modos de realización. Dicha descripción se hizo con referencia a los dibujos anexos en los cuales:

La Figura 1 ilustra la acidificación del medio por diferentes cepas a bajas temperaturas en función del tiempo.

La Figura 2 ilustra el desarrollo de la cepa CRYOCB002 a diferentes temperaturas.

La Figura 3 ilustra el índice de desarrollo de la cepa CRYO-CB002 con 10 o 20 g/l de glucosa, lactosa, galactosa, fructosa o sacarosa.

La Figura 4 ilustra un ejemplo de cinética de acidificación del medio por una bacteria láctica.

- 5 La Figura 5 ilustra la evolución de la fuerza del gel en función de la concentración de gelatina y de la fuerza de Bloom.

La Figura 6 ilustra la evolución del pH del medio en función de diferentes cantidades de inóculo de la cepa CRYO-CB022 para dos casos de condiciones de conservación.

La Figura 7 ilustra la evolución del pH en función de la concentración de gelatina.

- 10 La Figura 8 ilustra la acidificación del medio por la cepa CRYO-CB002 a 8°C con diferentes concentraciones de glicerol.

La Figura 9 ilustra la velocidad de acidificación del medio por la cepa CRYO-CB002 en función del pH inicial para dos temperaturas.

- 15 La Figura 10 ilustra la acidificación del medio por la cepa CRYO-CB002 (inóculo 1.10E4) en presencia de 2% de glucosa o 2% de manitol.

La Figura 11 presenta una fotografía que muestra la precipitación de la caseína y la variación del indicador mixto durante la acidificación del medio por bacterias lácticas.

La Figura 12 ilustra una etiqueta según la invención.

La Figura 13 ilustra una ventaja de la invención.

- 20 La Figura 14 ilustra un rollo de indicadores según la invención y los medios de asociación de los indicadores a los productos.

Las Figuras 15 y 16 son gráficos que ilustran ejemplos de utilización del procedimiento según la invención.

- 25 Se recuerda aquí la determinación de la FLC o de la FLUO de un producto perecedero (norma AFNOR NF V-01-003). Para un producto perecedero el tiempo de vida útil se determina en función de las temperaturas medias de conservación.

- 30 La norma AFNOR NF V-01-033, aprobada en febrero de 2004, relativa a la higiene y la seguridad de los productos alimentarios, ofrece las líneas directrices para la elaboración de un protocolo de ensayo de envejecimiento para la validación del tiempo de vida útil microbiológica de productos perecederos, refrigerados. Describe un método de evaluación de la fecha límite de consumo (FLC) o de la fecha límite de utilización óptima (FLUO) de un producto microbiológicamente perecedero.

- 35 La norma señala que la fecha límite de consumo o de utilización óptima de un producto perecedero debe determinarse teniendo en cuenta el grado de control de la cadena de frío por parte de los diferentes intervinientes (fabricante, transportista, distribuidor y consumidor). Por lo tanto, esta fecha límite se determina en función de las condiciones medias, generalmente observadas a lo largo de la cadena de frío durante la conservación de un producto.

Esta norma define tres casos de ejemplos concretos para determinar esta fecha límite en función del nivel de control estimado de la cadena de frío.

Si la cadena de frío está totalmente controlada, la fecha límite se determina para un producto conservado durante toda su vida útil a la temperatura óptima (+4°C, por ejemplo, para la mayoría de los productos alimentarios).

- 40 Si la cadena de frío está parcialmente controlada, la fecha límite se determina para un producto conservado dos tercios del tiempo de su vida útil a la temperatura óptima (por ejemplo, +4°C) y un tercio del tiempo a la temperatura razonable de ruptura de la cadena de frío (en general, +8°C).

- 45 Si la cadena de frío está insuficientemente controlada, la fecha límite se determina para un producto conservado un tercio del tiempo de su vida útil a la temperatura óptima y dos tercios del tiempo a la temperatura razonable de ruptura de la cadena de frío.

De este modo, la fecha límite de consumo o de utilización óptima de un producto es un valor fijado a priori en función de datos estadísticos y de condiciones de conservación supuestas, siendo esta fecha fija y sin evolución en función de las condiciones de conservación reales del producto perecedero. El problema es que esta fecha límite es un valor estático que no puede indicar el tiempo de vida útil real del producto puesto que su modo de determinación supone

el nivel de control de la cadena de frío ejercido sobre un producto por los diferentes intervinientes (fabricante, transportista, distribuidor y consumidor). Por lo tanto, esta fecha límite es sólo una indicación teórica y estática del estado sanitario del producto perecedero después de un período determinado.

- 5 El procedimiento permite aportar una solución a este problema y reducir los riesgos sanitarios indicando la fecha límite de consumo o la fecha límite de utilización óptima de manera dinámica para cada producto individualmente en función de las condiciones de conservación a las cuales se habrá sometido efectivamente a dicho producto.

- 10 En una primera aplicación, el indicador puede parametrizarse para cada cambio de estado en la fecha límite de consumo o de utilización de un producto perecedero tal como se determina según la norma AFNOR NF-01-033. Si las condiciones de conservación del producto son peores que las condiciones medias previstas por esta norma, el indicador señala que el producto deja de ser apto para el consumo antes de la fecha prevista inicialmente; si las condiciones de conservación del producto son mejores (temperatura de conservación óptima sin ninguna ruptura de la cadena de frío o de congelación del producto) que las condiciones medias previstas, el indicador señala que el producto sigue siendo apto para el consumo más allá de la fecha prevista inicialmente.

- 15 En una segunda aplicación, sobre la base de un estudio de la degradación microbiológica específica de cada producto, el indicador puede parametrizarse para evolucionar de manera idéntica al producto en función de sus condiciones de conservación (tiempo y temperatura) y de este modo sustituirse totalmente la FLC o la FLUO del producto tal como se determinó según las normas actuales y tal como el consumidor la conoce en la actualidad. Esto es posible mediante una parametrización del indicador basada en la velocidad de degradación microbiológica real del producto.

- 20 Existen numerosos productos que son perecederos y sensibles a la degradación o a la alteración, microbiológica o no, en función de su vida útil y de su temperatura de conservación. Preferentemente, se trata de productos alimentarios frescos o congelados, por ejemplo, vendidos en tiendas o distribuidos por empresas de restauración (en enlace caliente o frío), de medicamentos (vacunas, colirios), de sustancias médicamente activas (sangre), de productos químicos termosensibles (reactivos de diagnóstico o de análisis, reveladores fotográficos), de productos cosméticos, de flores cortadas o de productos consumibles sensibles (vinos, aguas minerales, cigarros). Cada uno de esos productos posee su propia sensibilidad y su propia cinética de degradación en función de la temperatura y del tiempo de conservación y, por consiguiente, su propia fecha límite de consumo o fecha límite de utilización óptima en las condiciones de conservación recomendadas. En la tabla siguiente se ofrecen algunos ejemplos:

PRODUCTO	CONSERVACIÓN	
	Temperatura	Vida útil
Corte de ave	0°C a + 4°C	7 días
Picadillos	0°C a +4°C	29 días
Taquitos de tocino	0°C a + 4°C	50 días
Platos cocinados enlace frío	0°C a +3°C	1 a 6 días
Platos cocinados enlace caliente	> a + 63°C	Unas horas
Sangre	+2°C a +8°C	42 horas
Vacunas	+2°C a +8°C	2 a 6 meses
Agua mineral	+18°C a +20°C	15 días después de la apertura
Chocolate	+8°C a +18°C	12 meses
Antitrombóticos	+15°C a +25°C	24 meses

- 30 El indicador según la invención es parametrizable a fin de abarcar las diferentes FLC o FLUO correspondientes a los productos perecederos, de manera que su cambio de estado interviene en la fecha prevista si el producto se conserva en las condiciones que se han seleccionado para fijar esa fecha límite.

El indicador:

El indicador se presenta bajo la forma de una etiqueta transparente de espesor reducido y de superficie adaptada a la utilización y al producto al cual se fijará. Según una realización, la etiqueta es autoadhesiva y su superficie es del tamaño de un código de barras para ser aplicada encima de éste como se describe en la solicitud de patente anterior W003/025529. De preferencia, el espesor de la etiqueta será lo suficientemente reducido para que resulte discreta y se integre al producto (o al envase) sobre el cual se fijará y no obstaculizará la lectura de la información que recubra. En una realización, las etiquetas autoadhesivas se entregan en rollos, tal como se representa en la figura 14-a, utilizables en una cadena de envasado automático o manual, y se colocan a mano, tal como se representa en la figura 14-c, o con la ayuda de una etiquetadora industrial, tal como se representa en la figura 14-b. Según esta realización, la fabricación y la utilización del indicador se efectúan a un ritmo elevado y a costos razonables para responder a las necesidades e imposiciones de la industria a gran escala.

Por lo tanto, el indicador comprende una envoltura transparente, facultativamente autoadhesiva, que contiene una sustancia microbiana acidificante, un medio de cultivo, los elementos de revelado de la acidificación y uno o varios texturizantes, como se indica en la Figura 12.

La envoltura transparente del indicador está, por ejemplo, constituida por al menos uno de los materiales siguientes: polietileno tereftalato (PET), polietileno (PE) y polipropileno (PP).

Sustancia microbiana:

Para la aplicación de la invención se utiliza una sustancia microbiana que hace variar el pH del medio en el que se encuentra; esta sustancia microbiana es un microorganismo que produce un ácido durante su crecimiento y su desarrollo o a través de su actividad metabólica. Esta sustancia se utiliza, por ejemplo, en la composición de productos alimentarios (sustancia microbiana positiva o técnica).

Además, la sustancia microbiana debe presentar una actividad acidificante a temperaturas compatibles con las temperaturas y los tiempos de conservación de los productos. Asimismo, su cinética de acidificación debe ser compatible con esas temperaturas y esos tiempos de conservación y está relacionada con las cinéticas de degradación de los productos perecederos. Por ese motivo, el indicador según la invención comprende al menos una cepa de bacterias seleccionada entre la cepa CRYO-CB001 y la cepa CRYO-CB002, que son bacterias lácticas. Esta última familia de bacterias se utiliza para la transformación y la conservación de numerosos productos alimentarios: por lo tanto, la mayoría de las bacterias lácticas no presenta ningún riesgo para el consumo. La mayor parte de esas bacterias son de categoría alimentaria. Se trata de una flora llamada positiva cuya inocuidad está normalmente asegurada. De este modo, es posible asociarlas, sin riesgo, a productos destinados al consumo.

Las bacterias lácticas producen ácido (fundamentalmente ácido láctico) a lo largo de su crecimiento y de su actividad metabólica. Por consiguiente, esas bacterias acidifican el medio en el cual se desarrollan. Esas propiedades acidificantes se conocen y utilizan en numerosas aplicaciones agroalimentarias.

Las bacterias lácticas se desarrollan naturalmente en numerosos productos alimentarios perecederos a temperaturas y velocidades de crecimiento cercanas a las de las floras de degradación y las floras patógenas. Por lo tanto, la utilización de bacterias lácticas permite reflejar las cinéticas de contaminación y degradación microbiológica de los productos sobre los que se fija el indicador.

En la familia de las bacterias lácticas se han seleccionado las cepas cuyo comportamiento, en función de las temperaturas y las velocidades de crecimiento, corresponde mejor a las cinéticas de desarrollo de los microorganismos que degradan los productos perecederos. Es importante que las velocidades y las temperaturas a las cuales los microorganismos se desarrollan, o poseen una actividad metabólica acidificante, sean compatibles con las temperaturas de conservación del producto perecedero y con las cinéticas de degradación o de alteración de esos productos.

Los productos perecederos se conservan generalmente en frío (entre 0°C y +4°C), pero son susceptibles de ser expuestos a temperaturas superiores durante una ruptura de la cadena de frío. Para el indicador se seleccionan cepas de bacterias lácticas psicrótrofas, que siguen siendo ligeramente mesófilas. Se trata de cepas capaces de vivir, desarrollarse o tener una actividad metabólica acidificante a temperaturas que en general oscilan de 0°C a +45°C. Según un modo preferente de realización, el crecimiento o la actividad metabólica acidificante debe ser de intensidad creciente de 0°C a +37°C para que la velocidad de crecimiento de esas cepas (o la intensidad de su actividad metabólica acidificante) sea compatible con la cinética de degradación del producto perecedero.

Por definición, las bacterias mesófilas son bacterias que pueden vivir a temperaturas que varían de +20°C a +45°C y cuyo desarrollo es óptimo a +37°C. Las bacterias psicrótrofas son bacterias cuyo desarrollo es óptimo a temperaturas que varían de +20°C a +30°C, pero que pueden vivir y desarrollarse a 0°C. Las bacterias psicrófilas son bacterias que pueden vivir a temperaturas que varían de -5°C a +30°C y cuyo desarrollo es óptimo a +15°C. Las bacterias criófilas son bacterias que se desarrollan en los medios fríos.

Para llegar a la invención se han estudiado las características de crecimiento de 131 cepas de bacterias lácticas, por ejemplo entre los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc* y *Weissella*. Se han seleccionado cepas capaces de crecer a bajas temperaturas (a partir de 0°C y como mínimo +4°C y +8°C). A continuación, se han medido los valores fundamentales (en función de la temperatura, el pH y la actividad del agua (aw) de las cepas que dan los mejores resultados.

Según la invención, entre esas cepas se han seleccionado dos cepas de la especie *Carnobacterium piscicola*, la cepa CRYO-CB001 y la cepa CRYO-CB002, aisladas por los inventores y registradas, respectivamente, bajo los números CNCM I-3297 y CNMC I-3298 en la Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos del Instituto Pasteur. Esas cepas pueden utilizarse debido a sus actividades metabólicas acidificantes a baja temperatura. La Figura 1 representa la acidificación del medio a +4°C y +8°C para el indicador parametrizado de la manera siguiente: Glucosa 20 g/l - Triptona 10 g/l - Extracto de levadura 5 g/l - Tween 80 1,08 g/l - Fosfato dipotásico anhidro 2,6 g/l - Sulfato de magnesio anhidro 0,222 g/l - Sulfato de manganeso anhidro 0,055 g/l - pH 6,2 - Inóculo 10E4 CFU/ml. Por ejemplo, la cepa CRYO-CB002 es capaz de crecer a temperaturas comprendidas entre -4°C y +37°C, tal como se representa en la Figura 2, resistiendo a temperaturas inferiores a -80°C y superiores a +47°C en el indicador. Esto permite abarcar la mayor parte de las temperaturas que pueden encontrarse durante la conservación de un producto perecedero y especialmente de un producto alimentario fresco.

La cinética de acidificación del medio contenido en el indicador, por la sustancia microbiana, depende del metabolismo de esta sustancia y también de la cantidad de sustancia microbiana introducida en el indicador. De manera general, cuanto más importante sea la cantidad de sustancia microbiana introducida en el indicador más rápida será la acidificación del medio. Esto es cierto para una formulación determinada del medio.

Por lo tanto, ello significa que la evolución del indicador depende del tipo y también de la cantidad de sustancia microbiana que contiene. De este modo, en función de las realizaciones, será posible introducir en el indicador mayor o menor cantidad de sustancia microbiana de manera de obtener una acidificación del medio y, por consiguiente, una señal de cambio de estado, más o menos rápida.

El medio de crecimiento

El indicador contiene una sustancia microbiana acidificante. Por lo tanto, esta sustancia microbiana debe encontrarse en un medio que permita su desarrollo, su crecimiento o su metabolismo acidificante.

Por ejemplo, cuando se utilizan bacterias lácticas, el indicador debe contener un medio de cultivo que permita la supervivencia y el crecimiento de las bacterias, pero también la producción de ácido por el metabolismo de esas bacterias.

En general, para un buen desarrollo bacteriano el medio de cultivo debe contener una fuente de carbono (en general un azúcar), una fuente de nitrógeno (en general de origen proteico), sales minerales, diversas vitaminas, oligoelementos o ácidos grasos esenciales.

Para su crecimiento, las cepas de bacterias lácticas pueden cultivarse en un medio que contenga diferentes fuentes de carbono. Pueden utilizarse los azúcares siguientes para el crecimiento de las cepas CRYO-CB001 y CRYO-CB002: glicerol, ribosa, galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, manitol, α metil-D-glucósido, N Acetil glucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa y β gentiobiosa.

El azúcar contenido en el medio, por ejemplo glucosa, sirve también para que las bacterias produzcan ácido láctico. Por lo tanto, también es necesario para la actividad acidificante de la bacteria. Ello significa que el indicador debe contener un azúcar utilizable por la bacteria para su metabolismo acidificante, por ejemplo glucosa o fructosa.

La naturaleza del azúcar utilizable por la bacteria, por ejemplo glucosa, fructosa, lactosa, galactosa o sacarosa, modifica la velocidad de crecimiento de las bacterias, por ejemplo de la cepa CRYO-CB002, tal como se muestra en la Figura 3, y la cinética de acidificación del medio.

En un modo preferente de realización, la glucosa se utiliza para el crecimiento y la actividad acidificante con las cepas CRYO-CB002 y CRYO-CB001.

Para el crecimiento de las bacterias lácticas también es necesaria una fuente de nitrógeno. Son utilizables diferentes fuentes, por ejemplo triptona, peptona o cualquier compuesto de origen proteico. El tipo y la cantidad de la fuente de nitrógeno contenida en el medio influyen en el desarrollo bacteriano.

La triptona y la peptona pueden utilizarse en un indicador con concentraciones de 1% o 2% en masa (w/w), solas o asociadas.

Según un modo de realización preferente, con la cepa CRYO-CB002 se ha validado un medio que contiene un 1% de peptona, y según otro modo de realización preferente con la misma cepa se ha validado un medio que contiene un 1% de triptona.

Como se recomienda para el medio MRS (de Man, Rogosa, Sharpe), se añade al medio extracto de levadura; también pueden añadirse sales (por ejemplo, NaCl, K₂HPO₄ y MgSO₄), necesarias o estimuladoras del crecimiento o del metabolismo.

Por ejemplo, un medio utilizado está compuesto por:

5

Triptona	1%
Extracto de levadura	0,58 %
Tween 80	0,108%
Fosfato dipotásico anhidro	0,26 %
Sulfato de magnesio anhidro	0,0222 %
Sulfato de manganeso anhidro	0,0055 %
Glucosa	2 %

Por consiguiente, la composición en nutrientes del medio influye sobre la velocidad de crecimiento de las cepas, sobre su actividad metabólica acidificante y, por lo tanto, en la parametrización del indicador.

10 Por último, el pH del medio que contiene la sustancia microbiana acidificante es importante. En efecto, el pH del medio debe ser compatible con el crecimiento y la actividad metabólica de la sustancia microbiana, por ejemplo un pH entre 9 y 4 para las bacterias lácticas. Por ejemplo, para la cepa CRYO-CB002 el pH óptimo de crecimiento es de 7,1. Para que pueda haber acidificación del medio por la sustancia microbiana el pH inicial de ese medio debe ser suficientemente elevado (en general, superior a 6 para las bacterias lácticas), siendo compatible con el desarrollo y el metabolismo acidificante de la sustancia microbiana.

15 Puesto que la cinética de acidificación influye en la parametrización del indicador, el pH inicial del medio que contiene la sustancia microbiana influye igualmente sobre esa parametrización.

Revelado de la acidificación:

20 En el indicador según la invención se simula la degradación de un producto perecedero mediante una sustancia microbiana. El desarrollo de la sustancia microbiana y su metabolismo acidificante se visualizan a través del seguimiento de la acidificación del medio contenido en el indicador. La acidificación del medio puede visualizarse con la ayuda de varios reveladores.

25 El final de la FLC o de la FLUO de un producto se traduce mediante el indicador cuando éste cambia de estado. El indicador cambia de estado cuando el pH del medio que contiene desciende por debajo de un valor determinado, de lo cual se ilustra un ejemplo en la Figura 4. El descenso del pH por debajo de un valor determinado se visualiza mediante un cambio de estado de uno o varios reveladores contenidos en el indicador.

Para visualizar la acidificación del medio se utilizan indicadores coloreados. Los indicadores coloreados son ácidos o bases débiles cuyas formas ácida y básicas tienen colores diferentes. Por lo tanto, el color de los indicadores cambia cuando el pH del medio que los contiene desciende por debajo, o sube por encima, del pK_i del indicador.

30 De este modo, el color del indicador puede cambiar a un pH determinado si el indicador coloreado que contiene posee un pK_i igual al pH en cuestión. Uno de los motivos en favor de la utilización de indicadores coloreados es que la señal mediante cambio de color puede interpretarse a simple vista. Además, el cambio de color interviene de manera directa e indiscutible, lo cual evita la confusión debido a una interpretación subjetiva.

35 Para el procedimiento pueden utilizarse numerosos indicadores, por ejemplo, rojo de metilo, indicador mixto, lacmoide (azul de resorcinol), antocianos, fenoltaleína, 2,4 dinitrofenol, naranja de etilo, benzopurpurina 4B, benzopurpurina B, hidrocloreto rojo de alfanafilo, tornasol, ácido aurina, ditiozono, azul de cromo, púrpura de bromocresol, índigo carmín, cacotelina, calceína, eosina extra, eriocromocianina, amarillo de tiazol, negro de eriocromo T, α-nitro β-naftol, naranja III, rojo de metilo, rodamina B, rodazonato de potasio, timolsulfoneftaleína, cloruro de rodio, trihidroxil2,6,7fenil9 isoxanteno, thorin (torón), sal tetrasódica de naranja de xileno.

40 En el indicador también pueden utilizarse los indicadores coloreados siguientes: alizarina, sulfonato sódico de alizarina, rojo de alizarina, benzopurpurina, benzoil auramina G, benzoiletilauramina, azul de resorcina, azul de bromoclorofenol, verde de bromocresol, azul de bromofenol, ácido carmínico, 2,4-dinitrofenol, ácido 4-(4-dimetilamino-1-naftilazo)-3-metoxibencenosulfónico, α-dinitrofenol, β-dinitrofenol, γ-dinitrofenol, 4,4-Bis (O-

- tolitriaceno)2,2'-estilbenodisulfonato disódico, 4,4-Bis(P-dimetilaminofenilazo)-2,2'-estilbenodisulfonato disódico, monohidrocloreto de 4-(P-etoxifenilazo)-M-fenileno-diamina, rojo de etilo, naranja de etilo, Rojo de hexameto, hidroquinolsulfonaftaleína, lacmoide, iodesina, lasmoide, N,N-dimetil-P-(M-tolilazo)Anilina, 4'-metoxi-2,4-diaminoazobenceno, rojo de metilo, rojo de metilo-alfazurina, α-naftilamina, α-naftilaminoazo-benceno, rojo de naftilo, azul de oxima, 4'-oxi-3'-metil-2,4-diaminoazobenceno, 4'-oxi-2,4-diaminoazobenceno, 4-fenilazo-1-naftilamina, paraformicina-ácido hexa-acético, paranitrofenol, P-etoxicrisoidina, P-sulfo-O-metoxibencenoazodimetil- αNaftilamina, rojo congo, rojo violeta, resazurina, rojo de naftilo, tetrabromocresol, tetraiodofenolsulfotaleína.
- Según realizaciones preferentes, se utilizan los siguientes indicadores: antocianos, fenoltaleína, 2,4 dinitrofenol, naranja de etilo, benzopurpurina 4B, benzopurpurina B, hidrocloreto rojo de alfa-naftilo, tornasol, rojo de metilo, indicador rojo, lacmoide.
- Según un modo de realización preferente específico, se utiliza el indicador mixto porque presenta cualidades estéticas y técnicas interesantes. Su cambio de color se efectúa a un pH cercano al pH de precipitación de la caseína y sus colores, verde antes de la variación de color y azul después de la misma, corresponden a un código de color utilizable por el gran público, especialmente en términos de marketing.
- No obstante, pueden utilizarse otros indicadores coloreados en función de las necesidades, especialmente de marketing, relacionadas con el producto perecedero y su envase.
- Otro medio para visualizar que se ha superado la fecha límite de consumo o de utilización de un producto perecedero consiste en convertir en opaco el indicador que al comienzo es transparente.
- En la solicitud de patente anterior W003/025529 se describió un procedimiento para controlar sistemáticamente un producto cuya conservación depende de la cadena de frío. La caducidad del producto puede detectarse sistemáticamente mediante el ocultamiento de un código de barras sobre el que se fija el indicador/la etiqueta.
- En un modo de realización, la etiqueta oculta un mensaje sobre el cual está fijada. Ese mensaje puede indicar que el producto es apto para ser consumido o utilizado siempre que sea legible.
- Cuando hay acidificación del medio puede utilizarse caseína para opacificar el indicador.
- La caseína es una de las principales proteínas de la leche. Más de la mitad de sus ácidos aminados llevan grupos ionizables libres. En la leche, la caseína se encuentra en un complejo salino en estado micelar. La disminución del pH provoca la precipitación de la caseína, que precipita totalmente hacia un pH de 4,7 en la leche. Si la acidificación se desarrolla progresivamente en el medio, debido a una fermentación láctica, se forma un coágulo homogéneo, como en el yogur. De este modo, la caseína soluble en la leche precipita en presencia de ácido láctico y se encuentra bajo una forma insoluble:
- $$\text{caseinato-Ca} + 2 \text{CH}_3\text{-CHOH-COOH} \Rightarrow \text{caseína} + (\text{CH}_3\text{-CHOH-COO})_2 \text{Ca}$$
- (Precipitación de la caseína por el ácido láctico)
- Esta reacción es muy utilizada en la industria agroalimentaria, durante la coagulación de la leche para la formación del queso fresco y después del queso salado y madurado.
- La caseína se presta perfectamente a la realización de la invención puesto que puede estar en solución transparente a pH básicos, neutros (pH 7) o ligeramente ácidos (superiores a su punto isoelectrico) y puede formar un precipitado opaco a pH bajos (inferiores a su punto isoelectrico). El pH de precipitación de la caseína varía en función de la fuerza iónica del medio y de la temperatura. En el indicador, en función de las concentraciones salinas seleccionadas, la caseína precipita a pH comprendidos entre 5,7 y 5.
- Además, la caseína es un producto poco caro, de categoría alimentaria, que se utiliza en numerosas aplicaciones de la industria agroalimentaria.
- La caseína puede extraerse de la leche por precipitación ácida seguidamente neutralizada mediante sosa (NaOH), potasa (KOH) o cal (CaOH). Se obtienen entonces caseinatos de sodio, de potasio o de calcio, respectivamente. La caseína puede ponerse nuevamente en solución mediante disolución de esos caseinatos.
- La caseína también puede extraerse de la leche por microfiltración o ultrafiltración tangencial. Gracias a este procedimiento, se recupera una caseína nativa más o menos contaminada por otras proteínas solubles de la leche.
- Para el indicador, pueden utilizarse caseinatos de sodio (Na⁺), de calcio (Ca⁺⁺), de potasio (K⁺) o de caseínas nativas (no precipitadas) de diferentes purezas.
- Preferentemente, en el indicador se introducen concentraciones de caseinato de sodio y caseinato de potasio del 5%, 6%, 7%, 8%, 9% y 10%. Se han utilizado caseínas nativas y caseinato de calcio a concentraciones del 0,5%, 0,75% y 1%. A esas concentraciones, las diferentes caseínas son solubles en el medio bajo forma transparente. Por lo tanto, permiten la lectura del código de barras a través del indicador.

La intensidad del precipitado, y por consiguiente la intensidad de la opacificación del indicador, depende de la concentración de caseína. Cuanto más elevada sea la concentración de caseína en el indicador mayor será la intensidad de la opacificación. La concentración de la caseína en el indicador debe ser suficiente para permitir la opacificación del indicador después de la precipitación e impedir la lectura del código de barras o del mensaje colocado debajo del indicador.

Preferentemente, debido a la fuerte intensidad del precipitado obtenido, en el indicador se utiliza caseinato de sodio. Preferentemente, ese caseinato se utiliza a concentraciones comprendidas entre el 8% y el 10%.

Los dos tipos de reveladores (indicador coloreado y caseína) pueden utilizarse conjuntamente o separados.

Si se utilizan conjuntamente, el indicador coloreado puede seleccionarse para cambiar de color al mismo pH al que se precipita la caseína. En ese caso, la señal de uno refuerza, o apoya, la señal del otro. Por ejemplo, el indicador coloreado refuerza la indicación, o añade a la precipitación de la caseína una señal adaptada al envase o a los gustos del consumidor.

Los dos tipos de reveladores también pueden utilizarse conjuntamente, pero seleccionando un indicador coloreado que cambie de color a un pH diferente al pH de precipitación de la caseína con el objeto de ofrecer dos mensajes sucesivos sobre la posibilidad de utilizar o no un producto perecedero.

Por ejemplo, la precipitación de la caseína puede producirse primero (a un pH de 5,2) y, ocultando el código de barras, ser una señal que indica que ya no es posible vender el producto (Fecha límite de venta) o que el producto debe consumirse rápidamente. La variación del indicador coloreado se produce a continuación (a un pH de 5 o 4,5) e indica que el producto no debe consumirse de ningún modo. Para ello debe seleccionarse un indicador coloreado cuyo pH de variación sea inferior al pH de precipitación de la caseína, siendo posible cuantificar y parametrizar esa diferencia.

También puede realizarse lo contrario, es decir la utilización de un indicador coloreado que varíe antes de que la caseína precipite, o sea un indicador que cambie de color a un pH mayor al pH de precipitación de la caseína.

La Figura 11 muestra una fotografía de un ejemplo de precipitación de la caseína y de variación del indicador mixto luego de una acidificación del medio según la invención (en este ejemplo, el indicador comprende bacterias lácticas).

Los texturizantes:

El indicador se presenta preferentemente bajo la forma de una etiqueta transparente de dimensiones reducidas, siendo el conjunto del envase y del contenido transparente o translúcido. El indicador es relativamente flexible y homogéneo para adaptarse a todos los productos perecederos y poder aplicarse sobre todos los envases cuya degradación se desea controlar.

Puede añadirse un texturizante al medio para conferirle el aspecto deseado. El texturizante elegido debe permitir el desarrollo de la sustancia microbiana en el indicador, la acidificación del medio y el revelado de esta acidificación según el modo seleccionado. Además, el texturizante añadido debe ser transparente y, si es posible, incoloro en solución en el medio para no interferir con el modo de detección de la acidificación, en particular si se utiliza el procedimiento de ocultamiento de un código de barras. Por último, el texturizante debe ser, preferentemente, de categoría alimentaria para facilitar la utilización del indicador en la industria agroalimentaria.

Según un modo de realización preferente, el texturizante utilizado es un espesante o un gelificante.

Los espesantes aumentan la viscosidad de una solución. Ralentizan o impiden, según su concentración y la temperatura, el flujo de la solución que los contiene. Son útiles en el indicador para mantener el medio en un estado homogéneo y uniforme.

Los gelificantes solidifican la solución que los contiene formando una red macromolecular que permite la formación de un gel más o menos flexible y elástico según el tipo de gelificante, su concentración y la temperatura. Se utilizan clásicamente en microbiología cuando se busca un soporte sólido para el crecimiento bacteriano. La gelificación del indicador puede resultar útil para permitir el mantenimiento del medio en un estado homogéneo y uniforme e impedir flujos en caso de que el envase del indicador esté perforado.

Entre los diferentes texturizantes que pueden utilizarse en el indicador figuran el agar o la agarosa (a concentraciones de 0,5 a 1,6%), diversas gelatinas de diferentes orígenes animales (cerdo, aves, buey) y de diferentes tejidos (piel, huesos), el xantano, el escleroglucano y el Gum Guar. La tabla siguiente agrupa diversos texturizantes que también pueden utilizarse:

ORIGEN	TIPO	FUNCIONES
Extractos de algas	Alginato	Espesante Gelificante
	Agarosa	Gelificante
Extractos de granos	Guar	Espesante
	Algarroba	Espesante
Extractos de subproductos vegetales	Pectina	Gelificante
Microorganismos, fermentación	Xantano	Espesante
	Goma Gellan	Gelificante
	Escleroglucano	Espesante
Animal	Gelatina	Gelificante

Preferentemente, se utilizará agarosa o agar, gelatina o escleroglucano.

De manera general, cuanto más elevada es la concentración de texturizante y más lentamente se desarrolla la sustancia microbiana contenida en el indicador más lenta es la acidificación del medio del indicador. Así, la concentración de texturizante influye sobre la parametrización del indicador.

Entre los texturizantes utilizables, la gelatina presenta la ventaja de emplearse en la fabricación de numerosos productos alimentarios y de ser de categoría alimentaria. Su costo es relativamente poco elevado, lo cual permite una utilización muy extendida. Existen gelatinas de diferentes orígenes (bovino, porcino, aves, pescado). En función de su origen y de su modo de preparación (extracción ácida o básica) y de la temperatura de extracción, las gelatinas pueden presentar diferentes características en términos de capacidad gelificante. Esta característica se mide por la fuerza de Bloom. Cuando más elevada sea la fuerza de Bloom de una gelatina más fuerte será el gel formado a una concentración determinada. Esto se ilustra en la Figura 5 (Chene C, 2000, La gelatina - Aspectos teóricos; Journal de l'ADRIANOR - Agro-Jonction N° 24). Por lo tanto, el aspecto del indicador podrá modificarse en función del tipo de gelatina elegido y de su fuerza de Bloom. Así, una gelatina con una fuerza de Bloom de 310 dará un gel mucho más sólido que una gelatina con una fuerza de Bloom de 200 a la misma concentración y a la misma temperatura.

En el indicador se utilizan especialmente gelatinas 150, 250 y 310 de cerdo, 150, 250 y 280 de buey, y P200 de aves a concentraciones de 0,125% a 20%.

Cuanto más fuerte es el gel formado, más lentamente se desarrolla la sustancia microbiana y, por lo tanto, más lenta es la acidificación del medio. Así, cuanto más elevada es la fuerza de la gelatina, más lenta es la acidificación del medio.

Asimismo, cuanto más concentrada es la gelatina (sea cual sea su fuerza de Bloom), más lento es el desarrollo microbiano y más lenta es la acidificación del medio.

Por consiguiente, la fuerza de Bloom de una gelatina y la concentración a la cual se utiliza esa gelatina influyen sobre la parametrización del indicador. Así, el tipo y la concentración del texturizante utilizado permiten hacer que varíen el aspecto del indicador y también la velocidad de acidificación del medio. Por consiguiente, puede utilizarse el texturizante para parametrizar el indicador en función del producto perecedero que debe controlarse.

Activación:

El indicador contiene una sustancia microbiana que se desarrolla y acidifica el medio más o menos rápidamente en función de la temperatura de conservación. El indicador se presenta bajo la forma de una etiqueta que debe colocarse sobre un producto perecedero. El indicador está parametrizado para seguir la degradación del producto al cual está asociado. Debe servir de Fecha Límite de consumo o de utilización óptima dinámica. Para ello, el inicio del proceso de acidificación debe corresponder al inicio de la FLC o FLUO del producto perecedero. Por comodidad y debido a razones económicas, la fabricación del indicador está separada, en el tiempo y en el espacio, de la fabricación y o del envasado del producto perecedero al cual está destinado. Para ello, el proceso de desarrollo microbiano y la acidificación del medio deben poder activarse de manera independiente de la fabricación.

Para separar la fabricación y la activación del activador pueden utilizarse dos tipos de procedimiento.

La congelación es un procedimiento de desactivación reversible del desarrollo microbiano utilizable para detener el crecimiento y el metabolismo de las bacterias contenidas en el indicador después de la fabricación. Una vez montado el indicador (el medio que contiene la sustancia microbiana colocado en el interior de la etiqueta), se congela a temperaturas negativas (temperaturas a las cuales normalmente deja de haber agua disponible en estado líquido), por ejemplo, de -18°C a -80°C . Pueden utilizarse temperaturas de congelación inferiores a -18°C . Esta temperatura corresponde a las normas de congelación vigentes en la industria agroalimentaria y en el uso doméstico y, por lo tanto, se utiliza preferentemente.

Una vez congelado, el indicador según la invención se mantiene estable durante varios meses. No se observa ningún desarrollo bacteriano y ninguna acidificación del medio. Bajo esta forma congelada el indicador puede almacenarse y transportarse del lugar de fabricación al lugar de utilización.

Las bacterias lácticas seleccionadas para el indicador según la invención soportan la congelación en el indicador y esta congelación no afecta a la capacidad de desarrollo de las bacterias a partir de que éstas son expuestas a temperaturas compatibles con su crecimiento. Asimismo, el sistema de revelado del indicador no resulta alterado por la congelación. Por lo tanto, la congelación deja intacto al indicador en lo que se refiere a su principio activo. Se trata de un procedimiento de desactivación totalmente reversible.

La activación del indicador se efectúa cuando dicho indicador se descongela colocándolo a una temperatura igual o superior a la temperatura a la cual es posible encontrar agua en estado líquido, en general a 0°C . Ello permite nuevamente el desarrollo microbiano y, por consiguiente, la acidificación del medio. El proceso de acidificación del medio y de revelado de esta acidificación se desarrolla entonces de manera idéntica al proceso descrito anteriormente.

Otra técnica utilizable en el procedimiento es un sistema de activación condicional del indicador. En ese sistema de activación condicional el indicador fabricado (sustancia microbiana en un medio en el interior de una etiqueta) no es activo directamente. La activación del indicador según este sistema debe realizarse separadamente de la fabricación mediante un procedimiento físico simple. Para fabricar un indicador no activo y activable condicionalmente es necesario aislar la sustancia microbiana de los nutrientes (y recíprocamente) para impedir cualquier desarrollo de la sustancia microbiana o su metabolismo acidificante.

Esta separación entre la sustancia microbiana y los nutrientes puede efectuarse mediante la incorporación al indicador de bacterias (o bien de nutrientes) encapsuladas de manera estanca. Ello requiere la fabricación previa de cápsulas, o perlas, que contengan la sustancia microbiana (o los nutrientes). Esas cápsulas deben ser relativamente pequeñas, estancas y estables en el medio contenido en el indicador. Según el tamaño de las cápsulas, se hablará de microencapsulación (diámetro medio de las cápsulas inferior a 1 mm) o macroencapsulación (diámetro medio de las cápsulas superior a 1 mm). La sustancia microbiana aislada del resto del medio por la cápsula no puede entonces desarrollarse ni acidificar el medio. Por lo tanto, el indicador está inactivo. El indicador fabricado de este modo se mantiene inactivo y estable en el tiempo, incluso a temperatura ambiente si las cápsulas también son estables a temperatura ambiente.

Para activar el indicador es necesario liberar la sustancia microbiana (o los nutrientes) en el medio. Para ello hay que romper las cápsulas, si es posible mediante un procedimiento físico simple (presión, ultravioleta (UV), choque térmico). La sustancia microbiana se libera entonces en el medio y puede volver a desarrollarse. Recíprocamente, si las cápsulas contienen los nutrientes, una vez rotas esas cápsulas, los nutrientes están disponibles para el desarrollo de la sustancia microbiana y la acidificación del medio en el indicador.

La activación del indicador es condicional, ya que se produce cuando las cápsulas se rompen y se libera en el medio la sustancia microbiana (o los nutrientes). Gracias a esta técnica, el indicador puede producirse a gran escala, almacenarse y transportarse a temperatura ambiente en el lugar de fabricación o de envasado del producto perecedero. El indicador puede entonces activarse cuando se desee.

Existen varias técnicas de micro o macroencapsulación que pueden utilizarse. Se utilizan, por ejemplo, la coacervación compleja, la encapsulación por atomización de emulsiones inversas o la encapsulación por precipitación de alginato de sodio. Estas técnicas pueden adaptarse a las necesidades específicas de la invención: tamaño reducido de las cápsulas, estanqueidad y estabilidad total en medio acuoso, ruptura mediante un procedimiento físico simple compatible con las limitaciones industriales y microbiológicas.

Otra manera de considerar la separación entre la sustancia microbiana y los nutrientes es fabricar un indicador constituido por dos compartimentos diferentes. Un compartimento contiene la sustancia microbiana en un medio sin nutrientes y el otro compartimento contiene los nutrientes aislados de las bacterias. Los dos compartimentos pueden separarse mediante una barrera transparente estanca, pudiendo esta barrera destruirse o interrumpirse mediante un procedimiento físico simple. Por ejemplo, si la barrera es una película de fabricación o de embalaje más frágil que la etiqueta que contiene el indicador, una presión de fuerza calibrada puede romper la película y poner en contacto los nutrientes y las bacterias.

En el caso de un sistema de activación condicional (encapsulación o compartimentación) las bacterias deben sobrevivir y mantenerse estables, incluso a temperatura ambiente, en un medio en ausencia de nutrientes. Por ejemplo, pueden utilizarse bacterias liofilizadas, o bien bacterias en un medio sin nutrientes y que no contenga sales.

Parametrización:

- 5 El indicador simula el desarrollo de las bacterias susceptibles de contener o de alterar el producto sobre el cual está fijado.

En una aplicación, el indicador está parametrizado en función de la FLC o FLUO definida por el fabricante, en general según la norma AFNOR NF V-01-003: si el producto se conserva en las condiciones de temperatura que son las utilizadas para definir esa fecha límite, el indicador cambia de estado en la fecha límite predefinida; si el producto se conserva a temperaturas óptimas (las menos propicias para la degradación del producto y/o el desarrollo microbiano) en relación con las supuestas por la norma, el indicador cambia de estado después de la fecha límite teórica; si el producto se conserva a temperaturas peores que las supuestas por la norma (temperaturas que propician la degradación del producto y/o el desarrollo microbiano) el indicador cambia de estado antes de la fecha límite teórica.

15 En otra aplicación, el indicador está parametrizado para reflejar la degradación, microbiológica o no, del producto perecedero. Esta parametrización se realiza, por ejemplo, luego de un estudio de microbiología previsual específico para cada producto o de un estudio de la evolución de las propiedades de estabilidad del producto. El cambio de estado interviene cuando las condiciones de conservación (tiempo y temperatura) del producto perecedero implican un nivel de alteración y de degradación de dicho producto incompatible con su consumo o su utilización, y ello independientemente de la noción misma de fecha límite.

La invención describe un indicador que constituye una fecha límite de consumo, o de utilización óptima, dinámica de un producto perecedero.

La velocidad de crecimiento de la sustancia microbiana y la velocidad de acidificación del medio por dicha sustancia microbiana deben adaptarse para reflejar la degradación del producto perecedero en función del tiempo y de la temperatura de conservación. Esta adaptación se efectúa mediante la parametrización del indicador.

Esta parametrización puede

(i) basarse en la FLC o la FLUO del producto perecedero, determinada según la norma AFNOR NF V-01-003; el indicador aporta entonces una dimensión dinámica en relación con esa fecha límite predefinida señalando que el producto ya no es apto para el consumo antes de esa fecha o, a la inversa, que el producto es apto para el consumo más allá de esa fecha, en función de sus condiciones reales de conservación;

(ii) basarse en un estudio de degradación microbiológica real del producto y, debido a que el indicador utiliza bacterias cuyo comportamiento refleja el comportamiento de las floras de degradación, ser el testimonio exclusivo del nivel de degradación del producto perecedero.

En todos los casos, el indicador debe parametrizarse para evolucionar de manera que refleje el nivel de degradación del producto en función de sus condiciones (tiempo y temperatura) de conservación.

La parametrización consiste en determinar el momento en el cual el indicador debe cambiar de estado, en función de la temperatura y del tiempo de conservación. Es decir, el momento en el cual el o los reveladores cambian de estado en el indicador.

Por lo tanto, la parametrización del par revelador/pH es fundamental. Así, hemos visto que la elección del indicador coloreado en función de su pH de variación es determinante.

Para un revelador determinado (por ejemplo, el Indicador mixto y/o el caseinato de sodio), y en las condiciones de fuerza iónica determinada (composición salina del medio que permita el desarrollo de la sustancia microbiana) el control del momento en que el pH del medio desciende por debajo de un umbral determinado es un factor esencial de la parametrización. Ello significa que es necesario un control de la cinética de acidificación del medio por la sustancia microbiana.

En general, cuanto más rápida sea la cinética de acidificación del medio más rápidamente cambiará de estado el indicador (a una temperatura determinada). Por consiguiente, conviene controlar la cinética de acidificación del medio en el indicador. Para controlar la cinética de acidificación conviene controlar principalmente los elementos siguientes:

- (1) la elección de la sustancia microbiana en relación con su capacidad para crecer a la temperatura de conservación del producto cuya evolución simulará;
- (2) la elección de la sustancia microbiana en relación con su capacidad para producir ácido;

- (3) la cantidad de sustancia microbiana introducida en el medio;
- (4) la cantidad de nutrientes necesaria para el desarrollo de la sustancia microbiana;
- (5) la cantidad de sustrato precursor necesaria para la producción de ácido por la sustancia microbiana;
- (6) el conjunto de los parámetros que pueden afectar al desarrollo de la sustancia microbiana;

5 (7) el pH inicial del medio.

(1) La sustancia microbiana debe seleccionarse en función de su cinética de crecimiento y de su actividad metabólica acidificante según la temperatura de conservación del producto. Según la invención, se seleccionan cepas psicrófilas para el seguimiento de la conservación de productos que deben mantenerse entre 0°C y +4°C, a saber las cepas CRYO-CB002 y CRYO-CB001, tal como se ilustra en la Figura 1.

10 Cuanto más psicrófila sea la cepa bacteriana seleccionada, más rápidamente cambiará de estado el indicador a baja temperatura (0°C, +4°C o +8°C). Asimismo, cuanto más lentamente crezca la cepa seleccionada menos rápida será su producción de ácido y menos rápidamente cambiará de estado el indicador a una temperatura determinada.

15 (2) La cantidad de sustancia microbiana introducida en el indicador (inóculo) influye sobre la cinética de acidificación del medio y, por consiguiente, sobre su parametrización. Cuanto menor sea la cantidad de sustancia microbiana introducida en el indicador, más tiempo será necesario para que el medio se acidifique. A la inversa, cuanto mayor sea la cantidad de sustancia microbiana introducida en el medio, más rápidamente se acidificará el medio (para una determinada formulación del medio). Para la cepa CRYO-CB002, la acidificación es más rápida a +4°C para un inóculo a 1,6.10E9 CFU/ml que para un inóculo de 5.10E7 CFU/ml de medio, tal como se presenta en la Figura 6-b (en este ejemplo el indicador comprende un 2,5% de gelatina bovina con un pH inicial de 7,2). Con esta misma cepa, en condiciones de FLC de 1/3 a +4°C y 2/3 a +8°C, la acidificación es más rápida con 1.10E7 CFU/ml que con 1.10E4 CFU/ml de medio, tal como se presenta en la Figura 6-a (en este ejemplo el indicador comprende un 2% de gelatina 200 de ave con un pH inicial de 6,4).

20 Así, para la cepa CRYO-CB002 y para una formulación determinada del medio, un inóculo de 10E5 CFU/ml permite una variación del indicador coloreado y una precipitación de la caseína en 11 días a +8°C, mientras que un inóculo de 10E7 CFU/ml permite una variación y una precipitación en 7 días en las mismas condiciones.

25 (3) La cantidad de nutrientes permite controlar la velocidad de desarrollo de la sustancia microbiana. Así, el indicador puede parametrizarse haciendo variar la composición del medio. Por ejemplo, la velocidad de desarrollo de una cepa bacteriana (y, por consiguiente, la velocidad de acidificación del medio) depende de los nutrientes presentes y de su concentración. Cuanto más propicio sea el medio al desarrollo microbiano más rápida será la acidificación del medio. Así, la utilización de Manitol produce una acidificación del medio, por la cepa CRYO-CB002, más lenta que en el caso de la utilización de glucosa tal como se presenta en la Figura 10 (en ese ejemplo, el indicador comprende un inóculo de 1.10E4 CFU/ml de la cepa CRYO-CB002 y 2% de glucosa o 2% de manitol).

30 (4) La cantidad de sustrato necesaria para la producción de ácido por la sustancia microbiana permite controlar la velocidad de acidificación del medio. En efecto, si el sustrato precursor del ácido fabricado (por ejemplo, un azúcar fermentable y, por ejemplo, la glucosa para una cepa de bacteria láctica) es una condición limitadora, será necesario más tiempo para que la sustancia microbiana produzca suficiente ácido para hacer que el pH descienda por debajo de un umbral determinado.

35 (5) Otros parámetros pueden influir en el desarrollo de la sustancia microbiana. Por ejemplo, la calidad y la cantidad de texturizante utilizado en el indicador. Por ejemplo, para un gelificante, cuanto mayor sea la fuerza del gel formado (debido a las propiedades del gelificante o a su concentración), menos rápidamente podrá desarrollarse la cepa, lo cual desacelerará la cinética de acidificación del medio. Por ejemplo, para una determinada formulación del medio y para una cepa determinada, la acidificación del medio es más lenta con un 3% que con un 2% de gelatina de ave (fuerza de Bloom 200), tal como se presenta en la Figura 7 (en este ejemplo, el indicador comprende un inóculo de 1.10E6 CFU/ml de la cepa CRYO-CB002 con gelatina 200 de ave a 2 y 3% con un pH inicial de 6,4 y para condiciones de conservación de 1/3 del tiempo a +4°C y 2/3 a +8°C).

40 La actividad del agua (aw) también es un parámetro importante para la velocidad de desarrollo de la sustancia microbiana. La aw (actividad del agua) expresa la disponibilidad de agua en un medio. Es importante distinguir el agua libre, no ligada químicamente (totalmente disponible para participar en las reacciones) y el agua químicamente ligada (no disponible, especialmente para los microorganismos). La aw es inversamente proporcional a la presión osmótica de un compuesto. Así, resulta afectada por la presencia más o menos importante de humectantes (NaCl (sales), glicerol, sorbitol, etc.) disueltos en el agua. La disponibilidad del agua presente en un medio o en una sustancia interviene en el desarrollo bacteriano. La reducción de la aw desacelera la actividad enzimática; aumenta la duración de la fase de latencia de los microorganismos y disminuye su velocidad de desarrollo. Así, modificar la concentración de glicerol o de cualquier otro humectante para hacer que varíe el valor de la aw, como se ilustra en la

45 tabla siguiente, resulta interesante y permite modificar y controlar los tiempos de desarrollo de las bacterias.

Aw	Porcentaje de glicerol en el medio (en g)	Porcentaje de NaCl en el medio (en g)
0,995	0	0
0,990	3	1
0,985	6	2,5
0,980	10	3,5
0,975	13,5	4,5
0,970	15	5
0,960	20	6,5

aw que corresponde al porcentaje de NaCl o de glicerol presente en el medio

5 En general, la reducción de la aw del medio, por debajo del valor de aw óptimo de una cepa, desacelera la cinética de acidificación del medio. Por ejemplo, cuanto mayor sea la concentración de glicerol o de NaCl en el medio más se desacelerará el cambio de estado del indicador (para determinada formulación de indicador). Por ejemplo, a +8°C, con la cepa CRYO-CB002, la acidificación es más lenta si el medio contiene 20% de glicerol que si contiene 12,5%, tal como se presenta en la Figura 8.

(6) Por último, el pH inicial del medio es importante para la parametrización del indicador.

10 Por un lado, el pH del medio debe ser compatible con el desarrollo y la actividad metabólica de la sustancia microbiana. Así, para la cepa CRYO-CB002, el pH debe estar comprendido entre 3,6 y 9,2. El pH del medio influye sobre la velocidad de desarrollo de la sustancia microbiana (por ejemplo, de las bacterias lácticas) y, por consiguiente, sobre su actividad acidificante. Los mejores desarrollos microbianos y, por lo tanto, las más rápidas cinéticas de acidificación se obtienen situándose en valores de pH próximos al pH óptimo de desarrollo de la cepa seleccionada (por ejemplo, pH 7,1 para la cepa CRYO-CB002).

15 Por otro lado, como el cambio de estado del indicador se debe al descenso del pH por debajo de un valor umbral, cuanto más se desvíe el pH inicial del medio del pH umbral más tiempo será necesario para que el pH del medio descienda (debido a la actividad acidificante de la sustancia microbiana) hasta ese valor umbral. En otros términos, cuanto más elevado sea el pH del indicador (y superior al pH óptimo de desarrollo de la cepa) más se retrasará el cambio de estado del indicador (para una temperatura determinada). Por ejemplo, la acidificación del medio por la
20 cepa CRYO-CB002 se produce más tardíamente si el pH inicial es de 9 que si es de 6,2, tal como se presenta en la Figura 9-a a +8°C (en este ejemplo, el indicador comprende 2,5% de gelatina 200 de ave y un inóculo 1.10E5 CFU/ml de la cepa CRYO-CB002) y en la Figura 9-b a +4°C (en este ejemplo, el indicador comprende un inóculo 1.10E6 CFU/ml de la cepa CRYO-CB002 y 15% de glicerol).

25 Por último, si el pH inicial del medio se tampona a un pH determinado (con un tampón Fosfato o Tris, por ejemplo), el pH del indicador descenderá más lentamente, lo cual retrasará el momento en el cual el o los reveladores cambiarán de estado. Por ejemplo a +8°C, para un medio 1% agar a pH 6,2; que contiene 2% de manitol; 15% de glicerol; 5% de caseinato de sodio; 3% de indicador mixto; inoculado a 1.10E4 CFU/ml con la cepa CRYO-CB002, el tiempo de precipitación es de 12 días cuando el pH inicial se ajusta con HCl y NaOH, y el tiempo de precipitación es de 17 días si se utiliza un tampón fosfato 0,1M.

30 Para la parametrización hemos tenido en cuenta los principales elementos que intervienen en la fabricación del indicador e influyen sobre la velocidad de desarrollo de la sustancia microbiana, así como sobre la velocidad de acidificación del medio por dicha sustancia microbiana.

35 La velocidad de acidificación determinará el tiempo necesario, a una temperatura determinada, para que el pH del medio alcance el valor umbral al cual el o los reveladores cambiarán de estado (por ejemplo, una precipitación de la caseína o una variación colorimétrica de un indicador coloreado).

Para ilustrar los datos sobre la parametrización del indicador y ofrecer la información necesaria para el ajuste del mismo, en la tabla siguiente se incluye una serie de ejemplos de formulación del indicador en función de las fechas límite de consumo, o de utilización óptima, relativas a diferentes temperaturas de conservación.

40 Para esos ejemplos los inventores se esmeraron en validar las fechas límite de consumo de productos perecederos tal como fueron previamente definidas por el fabricante en las condiciones de la norma AFNOR NF V 01-003 parametrizando el indicador en relación con dicha fecha.

FLC (tiempo de opacificación del indicador)	Condiciones de temperatura	Cepa	Inóculo CFU/ml	pH inicial	Medio
7 días	1/3 +4°C; 2/3 +8°C	CRYO- CB002	1.10E4	6,2	Glucosa 2% Agar 1% Caseinato Na+ 5%
10 días	1/3 +4°C; 2/3 +8°C	CRYO- CB002	1.10E4	6,2	Glucosa 2% Glicerol 15% Agar 1% Caseinato Na+ 5%
20 días	1/3 +4°C; 2/3 +8°C	CRYO- CB002	1.10E4	6,2	Manitol 2% Glicerol 20% Agar 1% Tampón fosfato 0,1M Caseinato Na+ 5%
11 días	2/3 +4°C; 1/3 +8°C	CRYO- CB002	1.10E4	6,5	Glucosa 2% Escleroglucano 1% Caseinato Na+ 10%
13 días	+4°C	CRYO- CB002	1.10E4	6,5	Glucosa 2% Xantano 0,25% Caseinato Na+ 10%
10 días	2/3 +4°C; 1/3 +8°C	CRYO- CB002	1.10E7		Glucosa 2% Gelatina 310 cerdo 1,6% Caseinato Na+ 10%
9 días	+8°C	CRYO- CB002	1.10E5	6,2	Glucosa 2% Gelatina 310 cerdo 1,2% Caseinato Na+ 10%

La invención no se limita a los modos de realización descritos y el especialista reconocerá la existencia de diversas variantes de realización, como por ejemplo la utilización en el indicador de una selección de cepas que resisten a las bajas temperaturas para seguir la evolución de un producto que podría sufrir una etapa de congelación, o incluso de una selección de cepas específicas a temperaturas más elevadas que las presentadas en esta descripción, o incluso la utilización de una mezcla de cepas seleccionadas.

Según otro de sus aspectos, la invención se refiere a un procedimiento para controlar la fecha límite real de consumo de un producto perecedero, alcanzándose esa fecha límite cuando el producto se conserva durante un tiempo determinado en las condiciones de temperatura recomendadas, procedimiento según el cual se asocia al producto un componente indicador que comprende:

- un microorganismo que presenta características de desarrollo determinadas en las condiciones de temperatura recomendadas para dicho producto, siendo estas características evolutivas en función del tiempo y de la temperatura,

- un medio de cultivo para el microorganismo, y

5 - un agente revelador que depende de un umbral de desarrollo del microorganismo,

de manera que el indicador ofrece una indicación de cambio de estado en la fecha límite recomendada cuando el producto se conserva en las condiciones de temperatura recomendadas, o antes de esa fecha o después de esa fecha cuando el producto se conserva en condiciones de temperatura peores o mejores, respectivamente.

10 En una realización, el microorganismo es un microorganismo que produce un ácido y el agente revelador depende del pH del medio.

En una realización, el agente revelador es la caseína, que forma un precipitado cuando el pH del medio desciende por debajo de un valor predeterminado.

El agente revelador puede ser un indicador coloreado que depende del pH.

15 Según la invención, el microorganismo es una población de bacterias lácticas del género *Carnobacterium* seleccionada entre la cepa CRYO-CB001 y la cepa CRYO-CB002.

En ese caso, el microorganismo puede ser una población de bacterias lácticas que pueden crecer a temperaturas inferiores a +8°C, preferentemente inferiores a +6°C, más preferentemente a una temperatura de +4°C o inferior. El microorganismo puede ser una población de bacterias lácticas que pueden crecer a temperaturas comprendidas entre +4°C y +50°C.

20 En una realización, el microorganismo puede congelarse y descongelarse.

En una realización, el medio de cultivo comprende los nutrientes necesarios para la supervivencia y el desarrollo de los microorganismos.

En una realización, el medio de cultivo comprende además precursores necesarios para una función acidificante.

En una realización, el medio de cultivo comprende además un agente texturizante.

25 En una realización, el componente indicador se presenta en forma de etiqueta, eventualmente adhesiva.

En ese caso, el componente indicador puede incluirse en una película, al menos una de cuyas caras comprende una zona que permite observar la señal producida por el agente revelador, que comprende una cantidad predeterminada de microorganismo acidificante en un medio de cultivo apropiado, un agente revelador. La etiqueta puede comprender también varios compartimentos internos, por ejemplo cápsulas, que permiten separar uno o varios constituyentes del componente de los otros durante un tiempo determinado, pudiendo romperse las paredes de dichos compartimentos por cualquier medio apto, por ejemplo por presión sobre la etiqueta.

30 En una realización, el producto perecedero es un producto alimentario o farmacéutico. Este producto perecedero es, por ejemplo, un producto alimentario destinado a ser conservado a una temperatura de +4°C aproximadamente, y en el cual el componente indicador comprende un microorganismo capaz de desarrollarse a una temperatura inferior o igual a +4°C.

35 La invención se refiere también a un componente indicador biológico que se caracteriza porque comprende, en un acondicionamiento, una población de microorganismos acidificantes que presentan características de desarrollo evolutivas en función del tiempo y de la temperatura, un medio de cultivo para el microorganismo, un agente revelador que depende del pH del medio, un agente texturizante, y al menos una zona de la superficie del envase que permite la observación de la señal producida por el agente revelador.

40 En una realización, los microorganismos están presentes en un compartimento aislado, por ejemplo cápsulas.

En una realización, los elementos constituyentes se seleccionan para permitir la producción de una señal por el agente revelador después de la conservación del componente durante un tiempo predefinido a una temperatura predefinida.

45 En una realización, el agente revelador es la caseína, que forma un precipitado cuando el pH del medio desciende por debajo de un valor predeterminado.

En una realización, el agente revelador es un indicador coloreado que depende del pH.

En una realización, el microorganismo es una población de bacterias lácticas del género *Carnobacterium* seleccionada entre la cepa CRYO-CB001 y la cepa CRYO-CB002.

En una realización, el microorganismo es una población de bacterias lácticas que pueden desarrollarse a temperaturas inferiores a +8°C, preferentemente inferiores a +6°C, más preferentemente a una temperatura de +4°C o inferior.

- 5 En una realización, el microorganismo es una población de bacterias lácticas que pueden desarrollarse a temperaturas comprendidas entre -4°C y +50°C.

En una realización, el microorganismo puede congelarse y descongelarse.

En una realización, el medio de cultivo comprende los nutrientes necesarios para la supervivencia y el desarrollo de los microorganismos, así como para la función acidificante.

- 10 La invención se refiere también a un procedimiento de preparación de un componente indicador biológico definido anteriormente que comprende la obtención de una población de microorganismos acidificantes que presentan características de desarrollo evolutivas en función del tiempo y de la temperatura, y el acondicionamiento de esos microorganismos en un medio de cultivo apropiado en presencia de un agente revelador que depende del pH del medio y, cuando sea necesario, de un agente texturizante, en un envase en el cual al menos una zona de la superficie permite la observación de la señal producida por el agente revelador.

- 15 En una realización, determinados elementos constituyentes del indicador se colocan en compartimentos separados, cuyas paredes pueden romperse.

La invención se refiere también al conjunto formado por un producto perecedero y un componente indicador, tal como se define en párrafos anteriores, que está asociado, especialmente mediante fijación, a ese producto.

En una realización, el componente indicador se fija por medios adhesivos.

- 20 En una realización, el componente indicador incluye varios compartimentos y se activa después de, o durante, la fijación mediante la ruptura de las paredes de los compartimentos.

En una realización, el producto perecedero es un producto alimentario o farmacéutico.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar si un producto, destinado a ser conservado por debajo de una temperatura límite en condiciones de temperatura y durante un tiempo que limiten su degradación, está o no en condiciones de ser utilizado o consumido, procedimiento en el cual se asocia al producto un indicador que suministra una señal que indica la posibilidad de utilización o de consumo del producto, y luego, después del vencimiento del tiempo de conservación, una señal que indica un cambio de estado de la posibilidad de utilización o de consumo del producto, evolucionando este tiempo en función de las condiciones de conservación del producto,
 - siendo el indicador que suministra la información de naturaleza tal que permite que el producto sea utilizable o consumible durante un tiempo más prolongado si fue conservado en mejores condiciones que las condiciones estándar o recomendadas, o durante un tiempo más corto si el producto fue conservado en peores condiciones que las condiciones estándar o recomendadas,
 - conteniendo el indicador al menos una sustancia microbiana con una actividad acidificante que hace variar el pH del medio en el cual se encuentra;
 - conteniendo dicha sustancia microbiana al menos una cepa de bacterias seleccionada entre:
 - la cepa CRYO-CB001 de la especie *Carnobacterium piscicola* registrada en la CNCM (Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos, París, Francia) bajo el N° CNCM I-3297, el 16 de septiembre de 2004; y
 - la cepa CRYO-CB002 de la especie *Carnobacterium piscicola* registrada en la CNCM (Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos, París, Francia) bajo el N° CNCM I-3298, el 16 de septiembre de 2004;
 - y en el cual se produce, con la ayuda de un revelador, la señal que indica el cambio de estado cuando el pH del medio en el cual se encuentra la sustancia microbiana desciende por debajo de un valor predeterminado.
2. Procedimiento según la reivindicación 1 en el cual el revelador forma un precipitado cuando el pH desciende por debajo del valor predeterminado.
3. Procedimiento según la reivindicación 2 en el cual el revelador está compuesto de caseína.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2 en el cual el revelador está compuesto al menos por un indicador coloreado.
5. Procedimiento según la reivindicación 4 en el cual el indicador coloreado se selecciona en el grupo siguiente: alizarina, sulfonato sódico de alizarina, rojo de alizarina, benzopurpurina, benzoil auramina G, benzoiletilauramina, azul de resorcina, azul de bromoclorofenol, verde de bromocresol, azul de bromofenol, ácido carmínico, 2,4-dinitrofenol, ácido 4-(4-dimetilamino-1-naftilazo)-3-metoxibencenosulfónico, α -dinitrofenol, β -dinitrofenol, γ -dinitrofenol, 4,4-Bis (O-tolilazeno)2,2'-estilbenodisulfonato disódico, 4,4-Bis(P-dimetilaminofenilazo)-2,2'-estilbenodisulfonato disódico, monohidrocloreto de 4-(P-etoxifenilazo)-M-fenileno-diamina, rojo de etilo, naranja de etilo, Rojo de hexametoxi, hidroquinolsulfonaftaleína, lacmoide, iodesina, lasmoide, N,Ndimetil-P-(M-tolilazo)Anilina, 4'-metoxi-2.4-diaminoazobenceno, rojo de metilo, rojo de metilo-alfazurina, α -naftilamina, α -naftilaminoazobenceno, rojo de naftilo, azul de oxima, 4'-oxi-3'-metil-2.4-diaminoazobenceno, 4'-oxi-2.4diaminoazobenceno, 4-fenilazo-1-naftilamina, parafucsina-ácido hexa-acético, paranitrofenol, P-etoxicrisoidina, P-sulfo-O-metoxibencenoazodimetil- α Naftilamina, rojo congo, rojo violeta, resazurina, rojo de naftilo, tetrabromocresol, tetraiodofenolsulfoftaleína, ácido aurina, ditiozona, azul de cromo, púrpura de bromocresol, índigo carmín, cacotelina, calceína, eosina extra, eriocromocianina, amarillo de tiazol, negro de eriocromo T, α -nitro β -naftol, naranja III, rojo de metilo, rodamina B, rodazonato de potasio, timolsulfoneftaleína, cloruro de rodio, trihidroxidimetilfenil isoxanteno, thorin (torón), sal tetrasódica de naranja de xileno, antocianos, fenolftaleína, benzopurpurina 4B, benzopurpurina B, hidrocloreto de rojo de alfa-naftilo, tornasol, rojo de metilo, indicador mixto, lacmoide (azul de resorcinol).
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5 en el cual, para adaptar el indicador al producto, se selecciona al menos uno de los parámetros comprendidos en el grupo siguiente: la naturaleza de la sustancia microbiana, la cantidad de esta sustancia microbiana, la naturaleza de los nutrientes, la cantidad de los nutrientes, la naturaleza de los elementos necesarios para la producción de ácido por la sustancia microbiana y la cantidad de esos elementos, la naturaleza de un texturizante del medio en el cual se encuentra la sustancia microbiana y la cantidad de ese texturizante, el pH inicial del medio, los parámetros que influyen en la actividad del agua (aw) del medio, la naturaleza del revelador utilizado para medir el descenso del pH y la cantidad de ese revelador, los parámetros que determinan el pH al cual ese revelador cambia de estado.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el cual los parámetros se seleccionan para que la señal que indica el cambio de estado aparezca al cabo de un tiempo predeterminado cuando el producto se conserva en las condiciones estándar o recomendadas.
8. Procedimiento según la reivindicación 6, en el cual los parámetros se seleccionan para que la señal que indica el cambio de estado aparezca cuando el producto deja de ser apto para el consumo.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 u 8 en el cual, en las condiciones estándar o recomendadas, se seleccionan los parámetros del indicador para que la señal que indica el cambio de estado aparezca después de un tiempo determinado, aumentándose este tiempo mediante la modificación de uno de esos parámetros desviándolo de los valores óptimos para la acidificación por la sustancia microbiana.
- 5 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 6 a 9 en el cual los nutrientes incluyen una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, y, preferentemente, sales minerales y/o vitaminas y/o oligoelementos.
- 10 11. Procedimiento según la reivindicación 10 en el cual la fuente de carbono se selecciona entre los azúcares del grupo siguiente: glicerol, eritritol, D-arabinosa, L-arabinosa, ribosa, D-xilosa, L-xilosa, adonitol, metilxilósido, galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, L-sorbose, Ramnosa, dulcitol, inositol, manitol, sorbitol, α metil-D-manósido, α metil-D-glucósido, N acetilglucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, lactosa, melibiosa, sacarosa, trehalosa, inulina, melecitosa, D-rafinosa, almidón, glucógeno, xilitol, β gentibiosa, D-turanosa, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, gluconato, 2 cetogluconato, 5 cetogluconato.
- 15 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 6 a 11 en el cual el texturizante se selecciona entre los del grupo siguiente: agar, agarosa, gelatina, xantano, escleroglucano, Gum Guar.
13. Procedimiento según alguna de las reivindicaciones anteriores en el cual el indicador se halla desactivado cuando no está asociado al producto y activado cuando está asociado al producto.
- 20 14. Procedimiento según la reivindicación 13 en el cual la desactivación se realiza con la ayuda de medios seleccionados en el grupo siguiente: congelación, microencapsulación de la sustancia microbiana y/o de los nutrientes, compartimentación.
15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 13 o 14 en el cual la activación del indicador se realiza mediante una acción física seleccionada en el grupo siguiente: variación de presión, variación de temperatura, variación de la longitud de onda de exposición a una radiación.
- 25 16. Procedimiento según alguna de las reivindicaciones 1 a 15 en el cual la sustancia microbiana es congelada o descongelada.
17. Aplicación del procedimiento según alguna de las reivindicaciones anteriores a productos de tipo alimentario, biológico o farmacéutico.
- 30 18. Aplicación del procedimiento según alguna de las reivindicaciones 1 a 16 a productos alimentarios en el cual el indicador se parametriza para que la aparición de la señal que indica un cambio de estado se retrase tanto como la temperatura de conservación del producto se aproxime a la temperatura óptima de conservación.
19. Aplicación del procedimiento según alguna de las reivindicaciones 1 a 16 a un producto alimentario destinado a ser conservado a temperaturas comprendidas entre 0°C y +4°C aproximadamente, y en el cual el indicador comprende una sustancia microbiana que tiene una actividad acidificante a temperaturas inferiores o iguales a +4°C aproximadamente.
- 35 20. Dispositivo para determinar si un producto está o no en condiciones de ser utilizado o consumido, estando destinado este producto a ser conservado por debajo de una temperatura límite en las condiciones de temperatura y durante un tiempo que limiten su degradación, comprendiendo este dispositivo al menos un indicador destinado a estar asociado al producto, siendo este indicador de tal naturaleza que suministra una señal que indica la posibilidad de utilización o de consumo del producto, y luego, después del vencimiento del tiempo de conservación, una señal
- 40 que indica un cambio de estado de la posibilidad de utilización o de consumo del producto, evolucionando este tiempo en función de las condiciones de conservación del producto,
- siendo el indicador de tal naturaleza que suministra una información que permite que el producto sea apto para la utilización o el consumo durante un tiempo más prolongado si fue conservado en mejores condiciones que las condiciones estándar o recomendadas, o durante un tiempo más corto si fue conservado en peores condiciones que
- 45 las condiciones estándar o recomendadas,
- conteniendo el indicador al menos una sustancia microbiana que tiene una actividad acidificante que hace variar el pH del medio en el cual se encuentra;
- conteniendo dicha sustancia microbiana al menos una cepa de bacterias seleccionada entre:
- 50 - la cepa CRYO-CB001 de la especie *Carnobacterium piscicola* registrada en la CNCM (Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos, París, Francia) bajo el N° CNCM I-3297, el 16 de septiembre de 2004; y
- la cepa CRYO-CB002 de la especie *Carnobacterium piscicola* registrada en la CNCM (Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos, París, Francia) bajo el N° CNCM I-3298, el 16 de septiembre de 2004;

conteniendo además dicho indicador un revelador y medios para suministrar una señal que indica el cambio de estado cuando el pH del medio en el cual se encuentra la sustancia microbiana desciende por debajo de un valor predeterminado.

5 21. Dispositivo según la reivindicación 20 en el cual el revelador es de naturaleza tal que forma un precipitado cuando el pH desciende por debajo del valor predeterminado.

22. Dispositivo según la reivindicación 21 en el cual el revelador está compuesto de caseína.

23. Dispositivo según una de las reivindicaciones 20 o 21 en el cual el revelador está compuesto al menos por un indicador coloreado.

10 24. Dispositivo según la reivindicación 23 en el cual el indicador coloreado está incluido en el grupo siguiente: alizarina, sulfonato sódico de alizarina, rojo de alizarina, benzopurpurina, benzoil auramina G, benzoiletilauramina, azul de resorcina, azul de bromoclorofenol, verde de bromocresol, azul de bromofenol, ácido carmínico, 2,4-dinitrofenol, ácido 4-(4-dimetilamino-1-naftilazo)-3-metoxibencenosulfónico, α -dinitrofenol, β -dinitrofenol, γ -dinitrofenol, 4,4-Bis (O-toliltriaceño)2,2'-estilbenodisulfonato disódico, 4,4-Bis(P-dimetilaminofenilazo)-2,2'-estilbenodisulfonato disódico, monohidrocloreto de 4-(P-etoxifenilazo)-M-fenileno-diamina, rojo de etilo, naranja de etilo, Rojo de hexametoxi, hidroquinolsulfonaftaleína, lacmoide, iodesina, lasmoide, N,N-dimetil-P-(M-tolilazo)Anilina, 4'-metoxi-2,4-diaminoazobenceno, rojo de metilo, rojo de metilo-alfazurina, α -naftilamina, α -naftilaminoazo-benceno, rojo de naftilo, azul de oxima, 4'-oxi-3'-metil-2,4-diaminoazobenceno, 4'-oxi-2,4-diaminoazobenceno, 4-fenilazo-1-naftilamina, parafulsina-ácido hexa-acético, paranitrofenol, P-etoxicrisoidina, P-sulfo-O-metoxibencenoazodimetil- α Naftilamina, rojo congo, rojo violeta, resazurina, rojo de naftilo, tetrabromocresol, tetraiodofenolsulfoftaleína, ácido aurina, ditiozona, azul de cromo, púrpura de bromocresol, índigo carmín, cacotelina, calceína, eosina extra, eriocromocianina, amarillo de tiazol, negro de eriocromo T, α -nitro β -naftol, naranja III, rojo de metilo, rodamina B, rodazonato de potasio, timolsulfoneftaleína, cloruro de rodio, trihidroxi2,6,7feni19 isoxanteno, thorin (torón), sal tetrasódica de naranja de xileno, antocianos, fenolftaleína, benzopurpurina 4B, benzopurpurina B, hidrocloreto de rojo de alfa-naftilo, tornasol, rojo de metilo, indicador mixto, lacmoide (azul de resorcinol).

25 25. Dispositivo según alguna de las reivindicaciones 20 a 25 en el cual al menos uno de los parámetros del indicador es de tal naturaleza que el indicador sea apto para el producto, estando comprendidos los parámetros en el grupo siguiente: la naturaleza de la sustancia microbiana, la cantidad de esta sustancia microbiana, la naturaleza de los nutrientes, la cantidad de los nutrientes, la naturaleza de los elementos necesarios para la producción de ácido por la sustancia microbiana y la cantidad de esos elementos, la naturaleza de un texturizante del medio en el cual se encuentra la sustancia microbiana y la cantidad de ese texturizante, el pH inicial del medio, los parámetros que influyen en la actividad del agua (aw) del medio, la naturaleza del revelador utilizado para medir el descenso del pH y la cantidad de ese revelador, los parámetros que determinan el pH al cual ese revelador cambia de estado.

30 26. Dispositivo según la reivindicación 25 en el cual el indicador es de tal naturaleza que los parámetros son de tales características que la señal que indica el cambio de estado aparece al cabo de un tiempo predeterminado cuando el producto se conserva en las condiciones estándar o recomendadas.

27. Dispositivo según la reivindicación 25 que comprende un indicador en el cual los parámetros son de tal naturaleza que la señal que indica el cambio de estado aparece cuando el producto deja de estar en condiciones de ser consumido o utilizado.

40 28. Dispositivo según alguna de las reivindicaciones 25 a 27 en el cual los nutrientes incluyen una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno.

29. Dispositivo según alguna de las reivindicaciones 20 a 28, que se caracteriza por contener un medio de cultivo que contiene una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno.

45 30. Dispositivo según una de las reivindicaciones 28 o 29 en el cual la fuente de carbono está comprendida entre los azúcares del grupo siguiente: glicerol, eritritol, D-arabinosa, L-arabinosa, ribosa, D-xilosa, L-xilosa, adonitol, metilxilósido, galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, L-sorbosa, Ramnosa, dulcitol, inositol, manitol, sorbitol, α metil-D-manósido, α metil-D-glucósido, N acetilglucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, lactosa, melibiosa, sacarosa, trehalosa, inulina, melecitosa, D-rafinosa, almidón, glucógeno, xilitol, β gentibiosa, D-turanosa, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, gluconato, 2 cetogluconato, 5 cetogluconato.

50 31. Dispositivo según alguna de las reivindicaciones 25 a 30 en el cual el texturizante está comprendido entre los del grupo siguiente: agar, agarosa, gelatina, xantano, escleroglucano, Gum Guar.

32. Dispositivo según alguna de las reivindicaciones 1 a 31, que se caracteriza por comprender un texturizante seleccionado en el grupo siguiente: agar, agarosa, gelatina, xantano, escleroglucano, Gum Guar.

55 33. Dispositivo según alguna de las reivindicaciones 20 a 32 en el cual el indicador es de tal naturaleza que se halla desactivado cuando no está asociado al producto y activado cuando está asociado al producto.

34. Dispositivo según la reivindicación 33 de naturaleza tal que la desactivación se realiza con la ayuda de medios comprendidos en el grupo siguiente: congelación, microencapsulación de la sustancia microbiana y/o de los nutrientes, compartimentación.
- 5 35. Dispositivo según una de las reivindicaciones 33 o 34 de naturaleza tal que la activación del indicador se realiza mediante una acción física seleccionada en el grupo siguiente: variación de presión, variación de temperatura, variación de la longitud de onda de exposición a una radiación.
36. Dispositivo según una de las reivindicaciones 20 a 35 en el cual la sustancia microbiana es congelable y descongelable.
- 10 37. Dispositivo según una de las reivindicaciones 20 a 36 en el cual el indicador se presenta bajo la forma de una etiqueta, preferentemente autoadhesiva.
38. Dispositivo según la reivindicación 37 en el cual el indicador comprende al menos una cara con una zona que permite observar la señal producida por el revelador.
- 15 39. Dispositivo según una de las reivindicaciones 37 o 38 en el cual la etiqueta comprende varios compartimentos internos, por ejemplo cápsulas, que permiten separar uno o varios elementos constituyentes del componente de los otros durante un tiempo determinado, pudiendo romperse las paredes de dichos compartimentos por cualquier medio apto, por ejemplo por presión sobre la etiqueta.

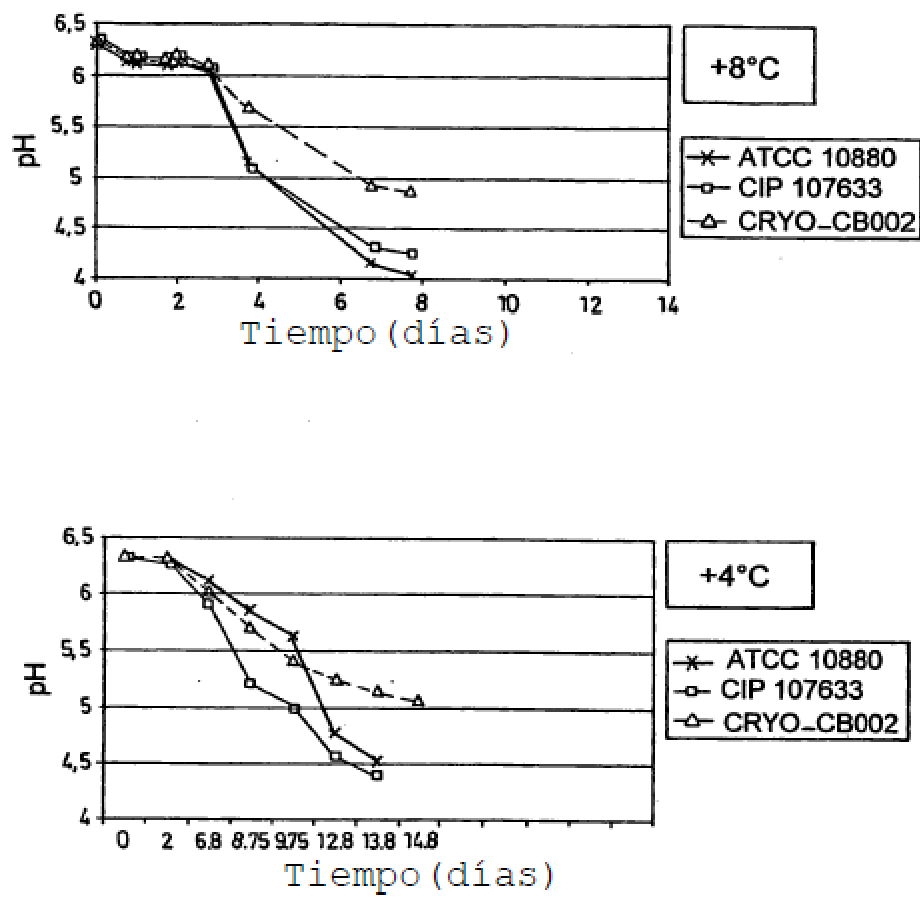
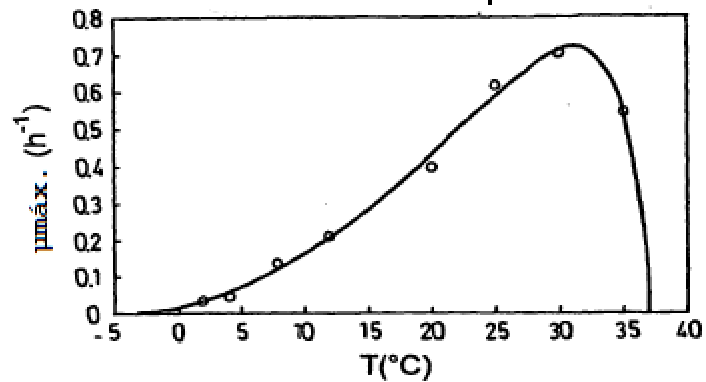


FIG.1

Evolución de la tasa de crecimiento
en función de la temperatura



$\mu_{\text{ópt.}} = 0.71939 [0.58436 \ 0.85443]$

$T_{\text{mín.}} = 4.4403 [-7.4423 \ -1.4384]$

$T_{\text{ópt.}} = 31.2177 [28.9724 \ 33.463]$

$T_{\text{máx.}} = 36.9907 [33.3416 \ 40.6398]$

$R^2 = 0.99486$

FIG.2

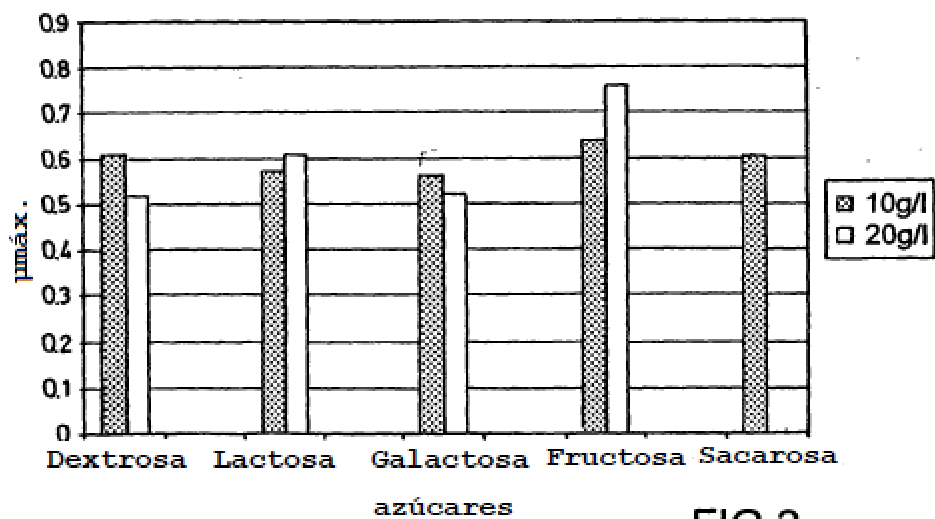


FIG.3

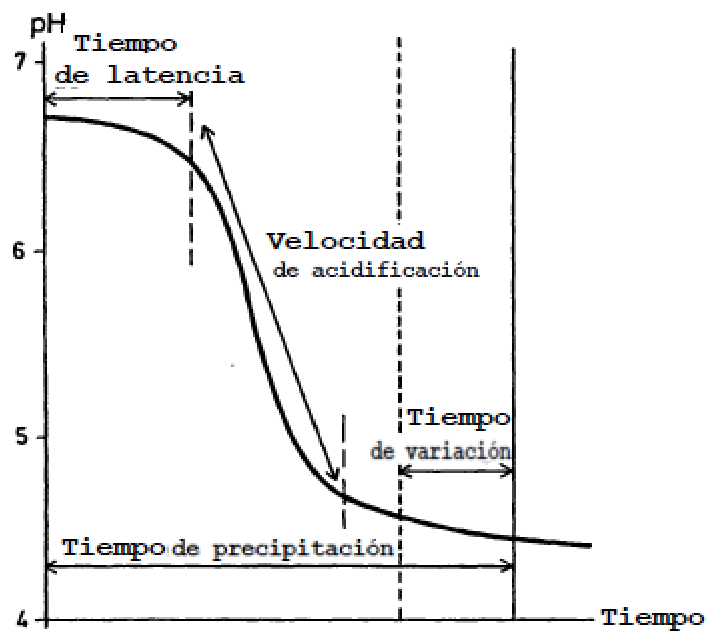


FIG.4

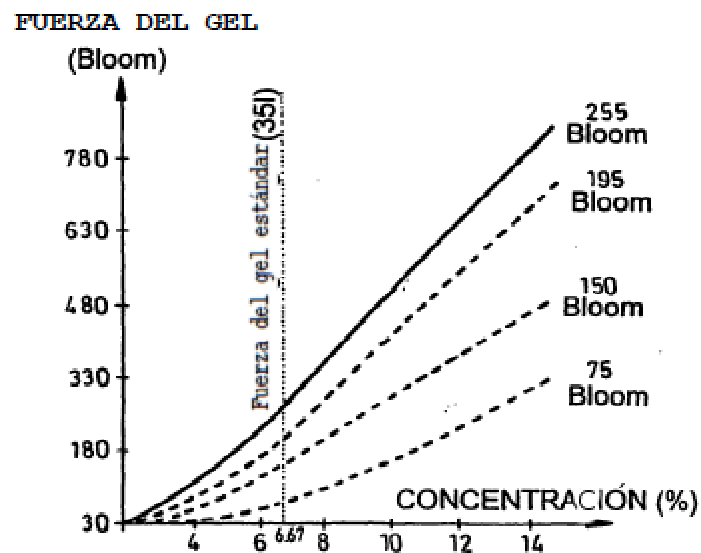


FIG.5

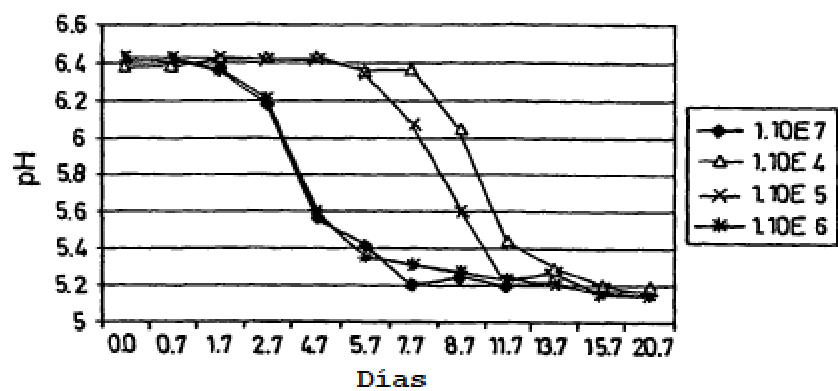


FIG.6a

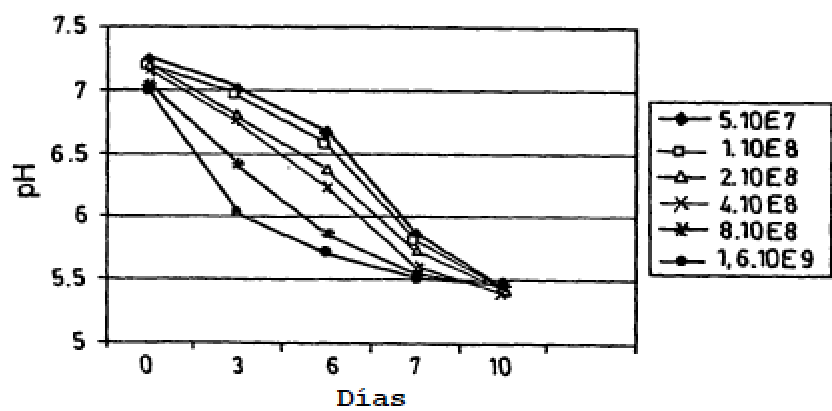


FIG.6b

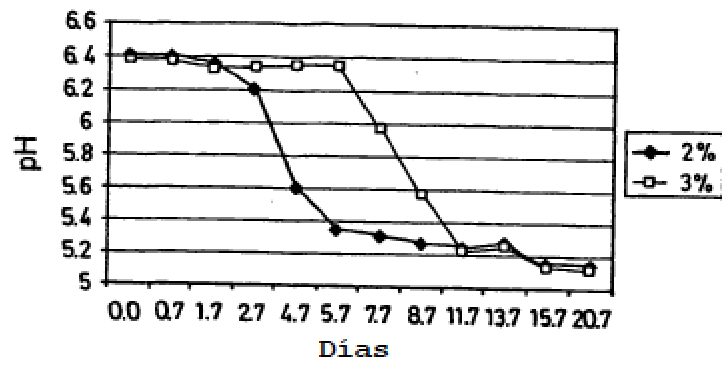


FIG.7

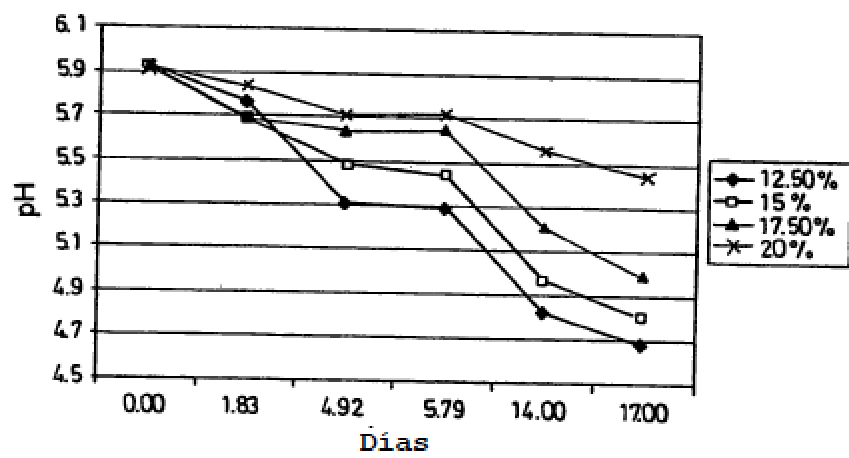


FIG.8

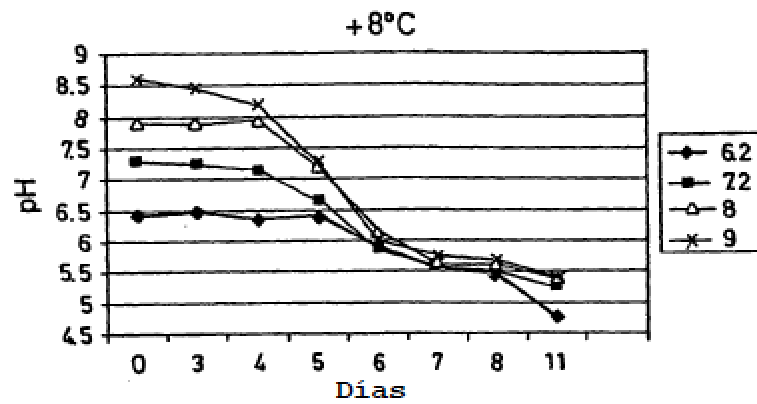


FIG.9a

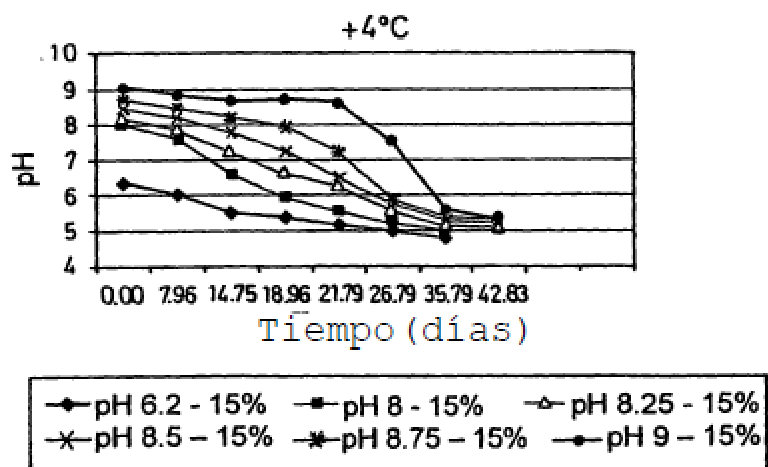


FIG.9b

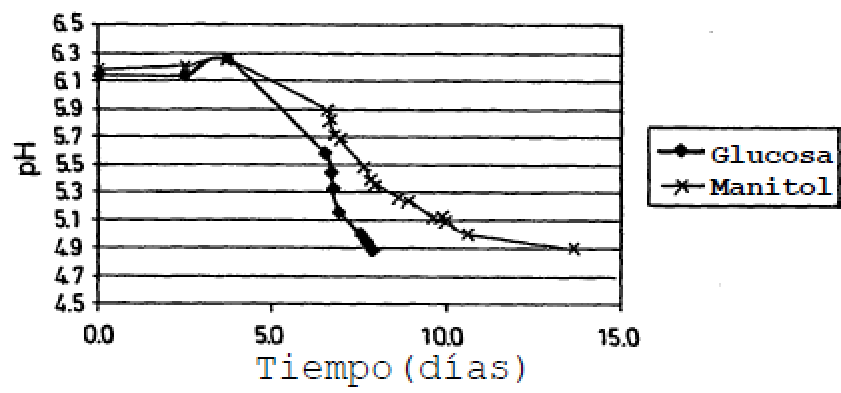


FIG.10

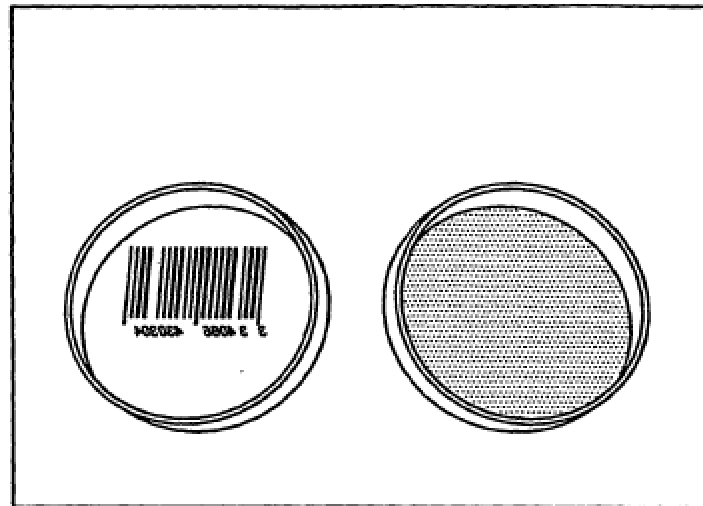


FIG.11

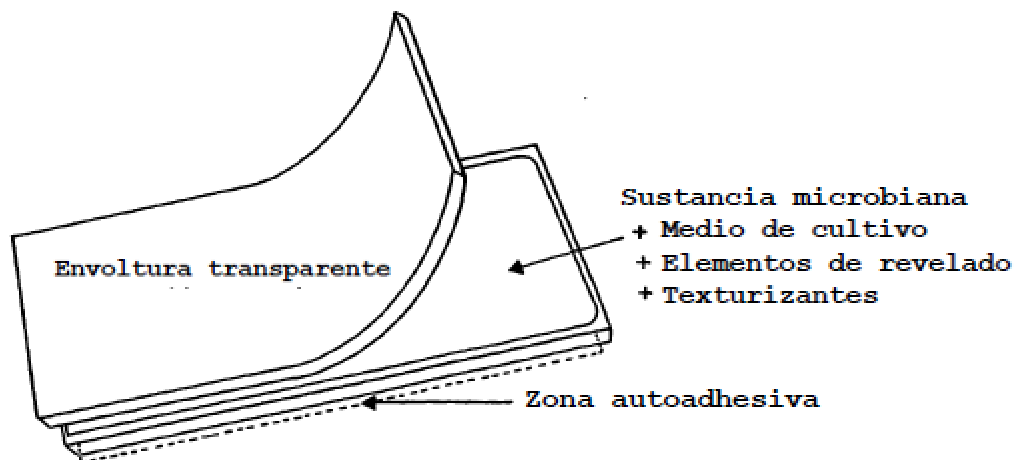


FIG.12

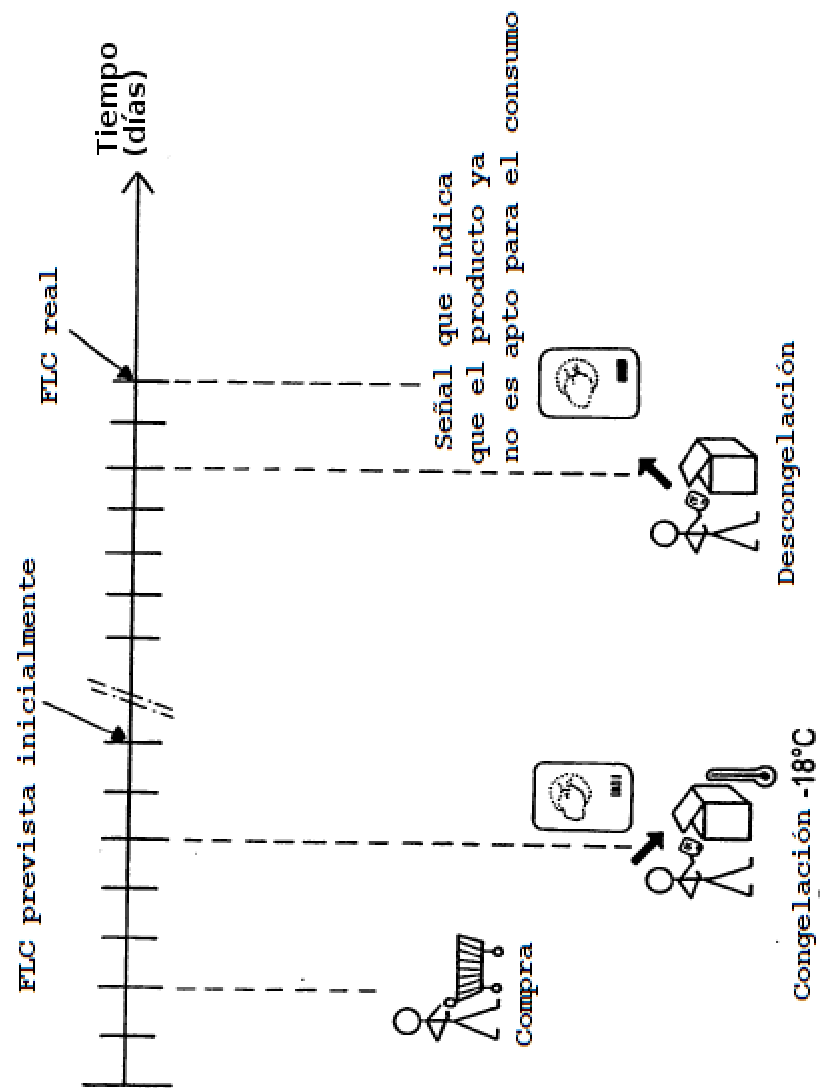


FIG.13

FIG.14a

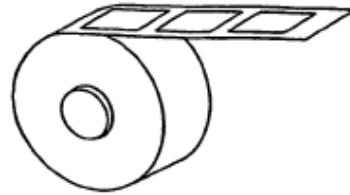


FIG.14b

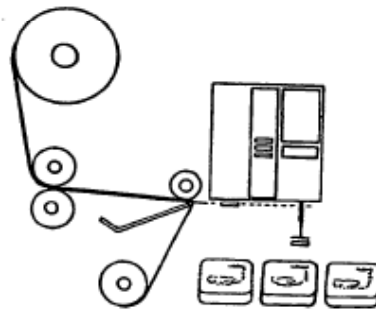


FIG.14c



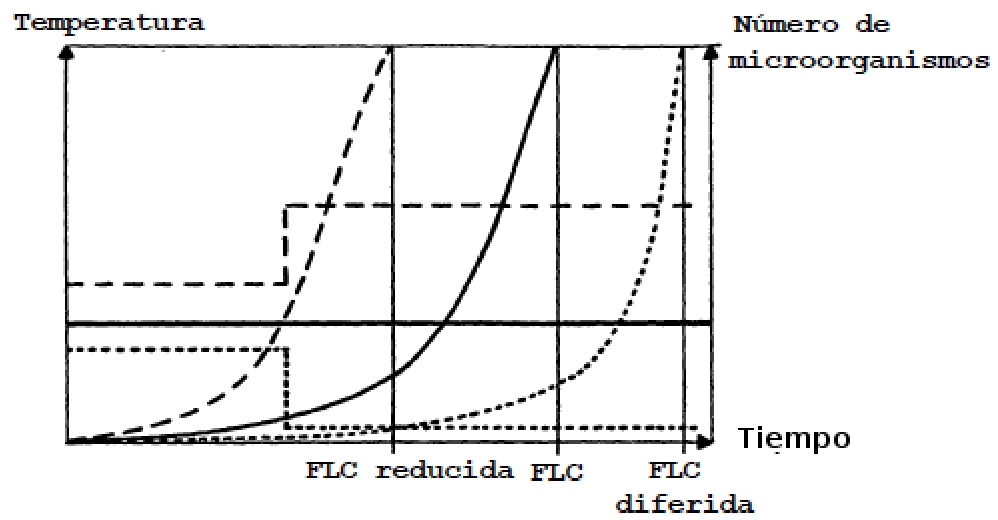


FIG.15

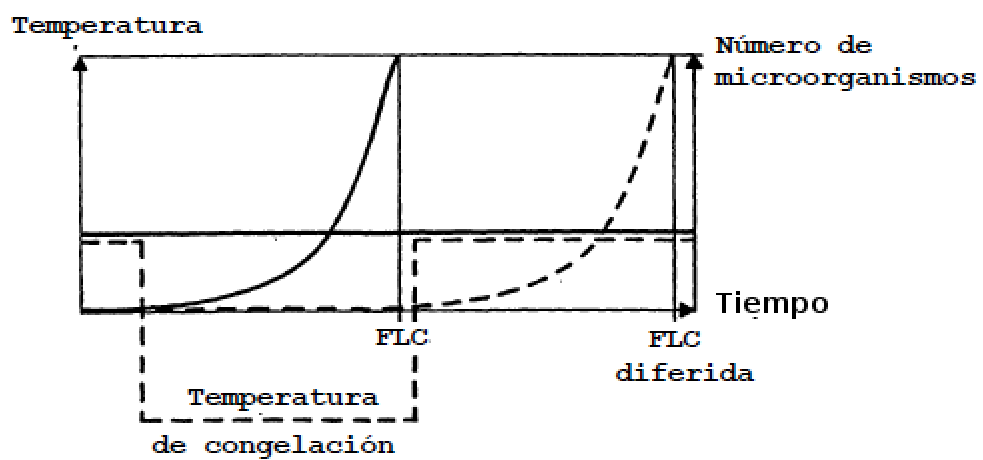


FIG.16