

# APLICACIÓN DE LA MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA EN LA INACTIVACIÓN ISOTÉRMICA DE *LISTERIA INNOCUA* CECT 910 EN UNA BEBIDA MEZCLA DE VEGETALES

## RESUMEN

Se obtuvieron cinéticas de inactivación por calor de *Listeria innocua* CECT 910 inoculada en una bebida de vegetales a tres condiciones de pH (4.25, 4.75 y 5.20), a cuatro niveles de temperatura (50, 55, 60, 65°C) y diferentes tiempos de exposición (0-75 min) con la finalidad de estudiar su evolución frente a dos factores de estrés (temperatura y pH). Las curvas de supervivencia obtenidas difieren de la forma lineal por lo que el ajuste se realizó a cuatro modelos matemáticos no-lineales: Weibull, Geeraerd, Cerf con Hombro y ecuación modificada de Gompertz, siendo mejor este último ya que presentó la mejor bondad de ajuste. La validación del modelo de Gompertz lo convierte en un modelo seguro y adecuado para describir el comportamiento de *L. innocua* en la bebida de vegetales permitiendo determinar valores de  $z$  para los tres niveles de pH.

## ABSTRACT

Were obtained thermal inactivation kinetics of *Listeria innocua* CECT 910 inoculated in a beverage of vegetables at three pH conditions (4.25, 4.75 and 5.20), four levels of temperature (50, 55, 60, 65°C) and different time from exhibition (0-75 min), with the purpose of studying their evolution as opposed to two factors of stress (temperature and pH). The survival curves obtained differ from the linear form reason why the adjustment was made to four non-linear mathematical models: Weibull, Geeraerd, Cerf with Shoulder and modified equation of Gompertz, being the best the one since it presented the best goodness of fit. After the model validation it becomes a safe model and adapted to describe the behavior of *L. innocua* in the beverage of vegetables allowing to determine values of  $z$  for the three levels of pH.

## RESUME (valenciano)

Es van obtindre cinètiques d'inactivación per calor de *Listeria innòcua* CECT 910 inoculada en una beguda de vegetals a tres condicions de pH (4.25, 4.75 i 5.20), a quatre nivells de temperatura (50, 55, 60, 65°C) i diferents temps d'exposició (0-75 min) amb la finalitat d'estudiar la seua evolució enfront de dos factors d'estrés (temperatura i pH). Les curves de supervivència obtingudes diferixen de la forma lineal pel que l'ajust es va realitzar a quatre models matemàtics no-lineals: Weibull, Geeraerd, Cerf amb muscle i equació modificada de Gompertz, sent millor este últim ja que va presentar la millor bondat d'ajust. La validació del model de Gompertz ho convertix en un model segur i adequat per a descriure el comportament de *L.*

*innòcua* en la beguda de vegetals permetent determinar valors de z per als tres nivells de pH.

**Palabras clave:** cinéticas de inactivación, *L. innocua*, tratamiento térmico bebida de vegetales, modelización, parámetros cinéticos primarios y secundarios.

## INTRODUCCIÓN

Existe evidencia científica en cuanto al rol del consumo de frutas y vegetales en la prevención de trastornos causados por la falta de nutrientes, enfermedades cardiovasculares y distintos tipos de cáncer. Se recomienda la ingesta diaria de unos 400g de estos alimentos debido al aporte de micronutrientes y sustancias benéficas para la salud (Steinmetz and Potter, 1996; WHO, 2003).

En los últimos años se ha incrementado el número de enfermedades transmitidas por alimentos asociadas con el consumo de frutas y vegetales crudos o mínimamente procesados y de zumos no pasteurizados. La FDA (2003) inició nuevas regulaciones para todos los zumos procesados, requiriendo que obtengan una reducción mínima de 5 ciclos logarítmicos del pertinente patógeno en el producto final.

Un proceso térmico efectivo es necesario para el correcto control en la eliminación de patógenos y la consecución de alimentos seguros. La microbiología predictiva es una herramienta útil para diseñar condiciones adecuadas de proceso.

La dependencia del patógeno del tiempo y la temperatura, se describe usualmente utilizando el concepto conocido de tiempo de destrucción térmica ( $D$ , valor decimal de reducción) y el diferencial de temperatura (valor  $z$ ) requerido para disminuir un ciclo logarítmico el valor de  $D$ . En la mayoría de los casos la tasa de destrucción térmica de la población microbiana sigue cinéticas de primer orden, sin embargo, últimamente se han observado significantes desviaciones en las curvas de supervivencia que incluyen hombros o períodos de retraso, seguido de una inactivación exponencial, al igual que colas o subpoblaciones de bacterias más resistentes al tratamiento.

Actualmente, la descripción de cinéticas de inactivación de forma no-lineal se han modelizado empleando modelos como el de Weibull, basado en la hipótesis que la resistencia al estrés de una población sigue una distribución Weibull (Peleg y Cole, 1998; Corradini y Peleg, 2003; Virto et al., 2005; Haimmer et al., 2006); modelo de Cerf, basado en la hipótesis de la existencia de dos subpoblaciones con diferentes niveles de resistencia al estrés (Cerf et al., 1977); o modelo de Baranyi (Baranyi and Roberts, 1994), Geeraerd (Geeraerd et al., 2000), Gompertz (Bhaduri et al. 1991), entre otros, capaces de ajustarse a curvas hasta de tipo sigmoideal.

Debido al riesgos que supondría trabajar con un microorganismo altamente patógeno como *Listeria monocytogenes* se ha preferido trabajar con *L. innocua* CECT 910, al ser un indicador biológico no patógeno para la inactivación térmica de *L.monocytogenes*. Frecuentemente, los indicadores biológicos son utilizados en estudios por ser no patógenos con características similares a la especie patógena tanto en fisiología como en metabolismo (Ponce et al., 1998; Murphy et al., 2002).

Este estudio está enfocado a describir el comportamiento de *L. innocua* CECT 910 inoculada en una bebida mezcla de vegetales, a tres distintos niveles de pH (4.25, 4.75, 5.20), sometida a tratamientos térmicos con variaciones de tiempo y temperatura, mediante el ajuste a modelos

matemáticos que más convengan, para posteriormente comparar la bondad de ajuste y validar el modelo más apto que permita dar respuesta a las necesidades planteadas por la NACMCF (2006) para establecer parámetros cinéticos primarios y secundarios, similares a los valores  $D$  y  $z$  del modelo de muerte térmica (NACMCF, 2006).

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Preparación de la bebida mezcla de vegetales**

La bebida de vegetales presenta la siguiente formulación: 31% tomate, 26% agua, 17% pimiento italiano, 9% apio, 5% pepino, 4% zanahoria, 3% cebolla, 2% solución de NaCl al 10%, 0.87% aceite de oliva virgen extra (v/v) y 0.03% polvo de albahaca (w/v). Los tres niveles de pH en la bebida se obtuvieron variando la cantidad de zumo de limón presente; para el pH de 4.25 el porcentaje utilizado fue del 2%, para el pH intermedio, 4.75, se utilizó un 0.5%, y en ausencia de zumo (0%) se consiguió un pH de 5.20. La medida de pH (Crison Instruments®, pH-metro GLP 21) fue realizada después de esterilizar la bebida.

El proceso de elaboración consistió en lavar los vegetales, pelar, cortar en trozos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, y ser sometidos por separado, a un escaldado a 90°C durante 4 min para inactivar enzimas. Posteriormente, cada vegetal fue licuado en batidora de vaso (Licuaturbo®, MOD LMO-9090) y filtrado (Tamiz No. 50, Serie ASTII, Luz <sup>m</sup>/<sub>m</sub> 0.297). Cada extracto obtenido se mantuvo en baño con agua y hielo hasta el momento de la mezcla. Finalmente, siguiendo las indicaciones de cada formulación, se preparó una cantidad considerable para las tres bebidas de mezcla de vegetales, según la concentración de zumo de limón añadida (2, 0.5 y 0%) y, se distribuyó en tubos falcon llenándolos con 9 mL para su ulterior almacenamiento a -40°C hasta los estudios de inactivación.

### **Recuperación del cultivo madre**

Las muestras liofilizadas de *Listeria innocua* CECT 910 fueron proporcionadas por la Colección Española de Cultivos Tipo. Para su rehidratación, se transfirieron a 10 mL de caldo de triptona de soja (TSB) (Scharlab Chemie S. A., Barcelona, España). Después de 30 min, 5 mL del cultivo anterior fueron inoculados en 200 mL de TSB incubándose a 37°C bajo agitación continua (200 rpm). Cuarenta mL del cultivo resultante fueron transferidos a 400 mL del medio e incubados durante 12 h, a la misma temperatura y condiciones de agitación. Transcurrido este tiempo, el cultivo se centrifugó por dos ocasiones a 4000 × g durante 15 min a 4°C y se resuspendió en 20mL de TSB. El cultivo inicial de las células de *L. innocua*, se depositó dentro de crioviales de plástico estériles de 2 mL adicionando TSB con un 20% de glicerol en relación 1:1. Las células fueron inmediatamente almacenadas a -80°C hasta que se necesitaron para estudios posteriores. La concentración aproximada fue de 5 x 10<sup>9</sup> UFC/mL.

## Preparación del cultivo para estudios cinéticos

La regeneración de células se llevó a cabo inoculando un criovial de *L. innocua* de los obtenidos anteriormente en 300 mL de TSB, realizando previamente las diluciones apropiadas con agua de peptona estéril (1%) para obtener una concentración final de  $10^3$ - $10^4$  UFC/mL; el período de incubación fue de 13 h a 37°C bajo agitación constante (200 rpm) para obtener células en fase de crecimiento estacionario. Transcurrido este tiempo, las células fueron centrifugadas a 4000 x g durante 15 min a 4°C y lavadas, ambos procesos en dos ocasiones. Después de la segunda centrifugación, las células fueron resuspendidas en 80 mL de medio y se depositaron respectivamente dentro de crioviales de plástico estériles de 2 mL adicionando TSB con un 20 % de glicerol a una relación 1:1. Las muestras de 2 mL fueron inmediatamente almacenadas a -80°C hasta que se necesitaron para los estudios de inactivación. La concentración estimada fue de  $1.30 \times 10^9 \pm 8.34 \times 10^8$  UFC/mL.

## Tratamiento con capilares

Previo a cada estudio de inactivación, los tubos con la bebida de la mezcla de vegetales necesarios para cada formulación fueron descongelados a temperatura ambiente y posteriormente transferidos a tubos de vidrio para su inmediata esterilización en autoclave (121°C, 21 min). Para los estudios de inactivación, 1 mL de microorganismo fue transferido a 9 mL de bebida de vegetales; este procedimiento se repitió para cada formulación. Tubos capilares (BlauBrand ®, Ref. 78744) previamente esterilizados (240°C, 24 h) se llenaron con 100 µl, de la suspensión celular, con la ayuda de una jeringa e inmediatamente se sellaron por la parte posterior con silicona blanca (RS Componentes) y la parte anterior con la ayuda de la llama. Aproximadamente de ocho a diez series de seis tubos capilares se llenaron para cada formulación.

Para los estudios de inactivación, las muestras se sumergieron en un baño de agua (HAAKE CF3) a 50, 55, 60 y 65°C. El tratamiento térmico se caracterizó por ser de tipo isotérmico considerando un "Come Up Time" (CUT) de 3 seg, tiempo necesario en alcanzar la misma temperatura en todo el capilar (termocupla tipo  $T \pm 0.1^\circ\text{C}$ , Control Company, Texas, USA). Seguidamente, los tubos fueron sacados del baño, a intervalos regulares (0 a 75 min), sumergidos en baño de hielo-agua y usados para la enumeración de unidades formadoras de colonias. Todos los tratamientos fueron dados por cuadruplicado. Una serie de tubos capilares sin tratar fueron utilizados como control.

## Enumeración de microorganismos

Para la suspensión de las células tratadas y de los controles se llevó a cabo una serie de diluciones decimales seriadas con agua de peptona estéril al 1% (Scharlab Chemie S. A.). El medio de enumeración para células viables usado fue agar de triptona y soja (TSA) (Scharlab Chemie S. A.). Las diluciones seleccionadas fueron incubadas a 37°C durante 48h. La reducción de células viables se expresó como el logaritmo decimal de la concentración final de células vivas.

## Análisis estadístico

Para evaluar los efectos del tiempo y la intensidad de temperatura en la inactivación microbiana de *L. innocua*, se utilizó un análisis multifactorial de la varianza (ANOVA). Para determinarse qué niveles de cada factor eran perceptiblemente diferentes ( $p < 0.05$ ) se aplicó la prueba de rangos múltiples (MRT), utilizando la distribución de Fisher (LSD) para contrastar la igualdad de varianzas. Todos los análisis estadísticos fueron hechos con Statgraphics centurion XV, StatPoint, Inc.

## Modelos matemáticos

Las curvas de supervivencia se ajustaron a cuatro modelos matemáticos, el ajuste de los tres primeros se llevó a cabo mediante la herramienta para la modelización de curvas de libre acceso GlnaFIT, Microsoft® Excel (Geeraerd et al., 2005), el cuarto modelo matemático evaluado no está incluido dentro del programa y las regresiones no lineales se realizaron mediante Statgraphics centurion XV, StatPoint, Inc.

## MODELO DE WEIBULL

La forma acumulativa de la función de densidad de la probabilidad de Weibull ha sido usada para describir la inactivación de microorganismos determinando diferentes resistencias de células individuales a tratamientos por calor y se identifica como sigue (Van Boekel 2002; Geeraerd et al., 2005):

$$\left( \frac{N}{N(0)} \right) = 10^{\left( -\left( \frac{t}{\delta} \right)^p \right)} \quad (1)$$

donde  $N$  (UFC/mL) representa la concentración final de células,  $N(0)$  (UFC/mL) es la concentración inicial de células;  $t$  es el tiempo (min);  $\delta$  es el parámetro de escala;  $p$  es el parámetro de forma, el cual corresponde a una curva cóncava hacia arriba si  $p < 1$ , una curva convexa hacia abajo si  $p > 1$ , y lineal si  $p = 1$  (Peleg and Cole, 1998).

La versión de dicha función de densidad incluida en GlnaFIT (Geeraerd et al., 2005), es la de Weibull propuesta por Mafart et al. (2002), que hace

posible reducir en forma natural el clásico modelo log-lineal de tal modo que el parámetro  $\delta$ , representa el tiempo para la primera reducción decimal:

$$\log_{10} N \approx \text{Log}_{10} N(0) - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (2)$$

## MODELO DE GEERAERD

Este modelo está basado en diversos argumentos que describen el comportamiento de los microorganismos cuando en curvas de inactivación se hacen presentes fenómenos de hombro, fase log-lineal y cola (Cerf 1977; Casolari 1988; Mossel et al., 1995; Geeraerd et al., 2000; Geeraerd et al., 2005). La incorporación de cada uno de los fenómenos se describe por la siguiente fórmula:

$$N(t) = (N(0) - N_{res}) \cdot e^{-k_{max} t} \cdot \left( \frac{e^{k_{max} S_1}}{1 + (e^{k_{max} S_1} - 1) \cdot e^{-k_{max} t}} \right) + N_{res} \quad (3)$$

donde  $N$  (UFC/mL) representa la concentración final de células;  $N(0)$  (UFC/mL) es la concentración inicial de células;  $N_{res}$  es la concentración de células residuales (UFC/mL);  $k_{max}$  es la velocidad específica de inactivación (1/unidad de tiempo);  $S_1$  es el parámetro que representa el hombro (unidades de tiempo);  $t$  es el tiempo (min).

## MODELO DE CERF CON HOMBRO

Cerf (1977) propuso un modelo de dos fracciones el cual se formula de la siguiente manera:

$$\text{Log}_{10}(N) = \text{Log}_{10}(N(0)) + \text{Log}_{10}(f \cdot e^{-k_{max1} t} + (1-f) \cdot e^{-k_{max2} t}) \quad (4)$$

donde  $N$  (UFC/mL) representa la concentración final de células;  $N(0)$  (UFC/mL) es la concentración inicial de células;  $f$  es la fracción de la población inicial considerada como subpoblación mayor y,  $(1-f)$  es la fracción de la población inicial considerada como la subpoblación menor (el cual es más resistente al calor que la subpoblación anterior);  $k_{max1}$  y  $k_{max2}$  (1/unidad de tiempo) son la velocidad específica de inactivación para las subpoblaciones respectivamente;  $t$  es el tiempo (min).

## ECUACIÓN MODIFICADA DE GOMPERTZ

La aplicación inicial de la ecuación modificada de Gompertz está dada para la descripción de curvas de crecimiento con forma sigmoideal (Gibson et al., 1987). La utilidad de la fórmula en curvas de supervivencia fue demostrada por Bhaduri et al. (1991) en la inactivación de *L. monocytogenes*

tras tratamientos térmicos, y la fórmula empírica empleada presenta la siguiente forma:

$$\text{Log}_{10}(N) = A - Ce^{-e^{-B(t-M)}} \quad (5)$$

donde  $N$  (UFC/mL) representa la concentración final de células;  $A$  es el valor más alto de la asíntota (UFC/mL);  $B$  es la velocidad de muerte relativa a  $M$  (1/unidad de tiempo);  $C$  es la diferencia entre el valor más alto y más bajo de la asíntota (UFC/mL);  $M$  es el tiempo (min) en el cual la velocidad absoluta de muerte es máxima; el signo de menos antes del parámetro  $C$  significa inactivación de microorganismos;  $t$  es el tiempo (min).

Con los parámetros de la función sigmoidea de Gompertz es posible derivar parámetros cinéticos relacionados con el crecimiento de microorganismos tales como, velocidad máxima de crecimiento, el tiempo de generación mínimo y tiempo de latencia (McMeekin *et al.*, 1993). Autores como Xiong *et al.* (1999) hicieron posible la caracterización de los parámetros cinéticos concernientes a la inactivación de microorganismos a través de las ecuaciones propuestas por McMeekin *et al.* (1993). En este estudio, el mayor interés es definir  $\mu_{\max}$  (velocidad máxima de muerte) determinada a través de la relación entre los parámetros  $B$  y  $C$  dividido por la constante neperiana:

$$\mu_{\max} = \frac{BC}{e} \quad (6)$$

### Comparación de modelos

Los datos experimentales se ajustaron mediante regresiones no lineales a los modelos matemáticos expuestos anteriormente. La bondad de ajuste fue evaluada mediante el cálculo de  $R^2$  (corregido) y  $RMS$ :

$$\text{Corrected}R^2 = \left[ 1 - \frac{(n-1) \left( 1 - \frac{SSQ_{regression}}{SSQ_{total}} \right)}{(n-j)} \right] \quad (7)$$

$$RMS = SD = \sqrt{\frac{SSQ_{residual}}{(n-j)}} \quad (8)$$

donde  $m$  es el número de observaciones,  $j$  es el número de parámetros del modelo,  $SSQ$  es la suma de cuadrados, y  $SD$  o  $RMS$  es la desviación estándar de los residuales (Reyns *et al.*, 2000; Ly-Nguyen *et al.*, 2003).



## Validación de modelos

Para la validación de los modelos experimentales se recurrió al cálculo del factor de ajuste ( $A_f$ ) y factor de exactitud ( $B_f$ ) descrito por Ross (1996) con un conjunto de datos experimentales seleccionados aleatoriamente y reservados para éste propósito:

$$A_f = 10^{\sum |\log(X_p / X_o)| / n} \quad (9)$$

$$B_f = 10^{\sum \log(X_p / X_o) / n} \quad (10)$$

donde  $n$  es el número de total de observaciones;  $X_o$  es el valor observado y  $X_p$  es el valor predicho.

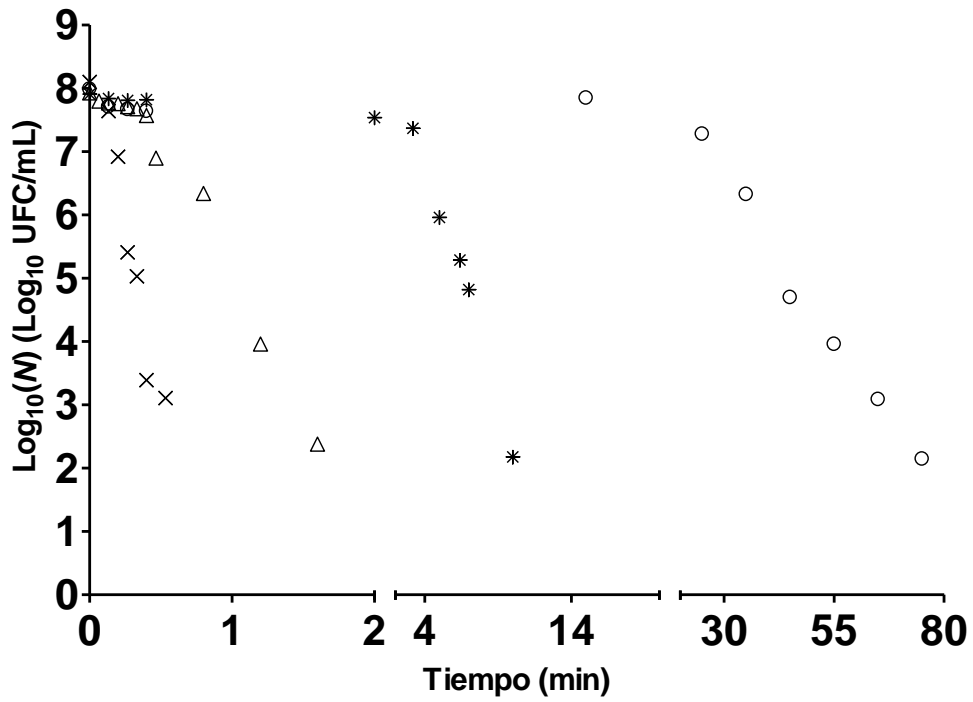
## RESULTADOS Y DISCUSION

### Curvas de supervivencia

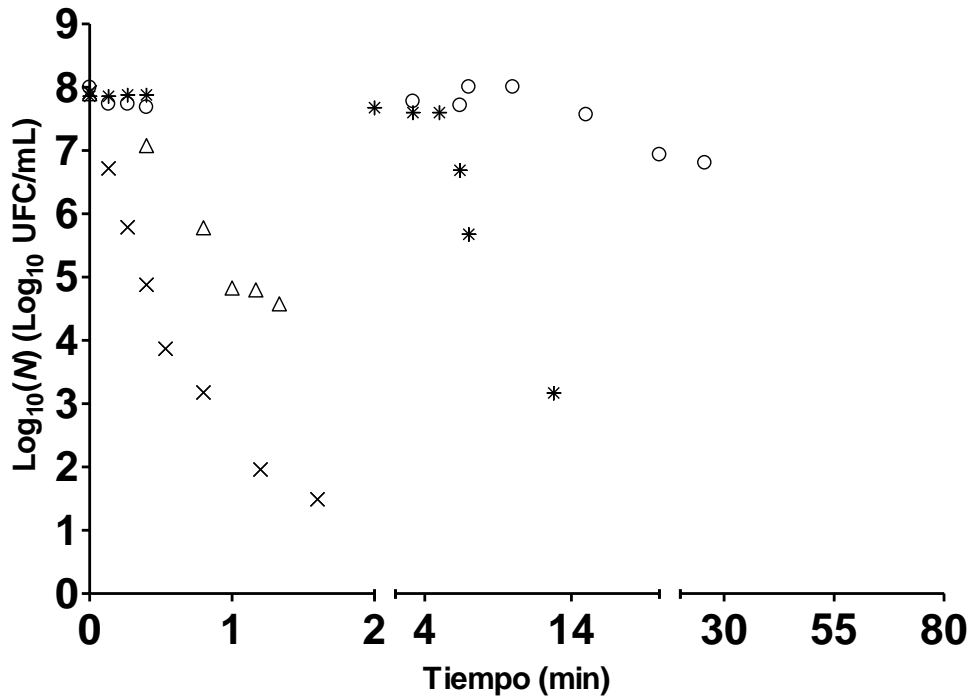
Se obtuvieron cinéticas de inactivación para células de *Listeria innocua* inoculadas en una bebida de vegetales, a tres niveles de pH (4.25, 4.75, 5.20), 4 niveles de temperatura (50, 55, 60 y 65°C) y diferentes tiempos de exposición (0 – 75 min). (FIGURA 1, 2 y 3). A la temperatura mínima de trabajo (50°C), para alcanzar la mínima inactivación requerida (1 ciclo logarítmico) se requirieron tiempos de 35, 20 y 55 minutos para el pH de 4.25, 4.75, y, 5.20, respectivamente. Evidentemente, mediante el aumento de la temperatura y del tiempo de exposición se incrementa la inactivación conseguida. Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el logaritmo del recuento final de células para cada temperatura y tiempo aplicado.

En concordancia con el límite establecido por NACMCF (1997) para tratamientos de pasterización de bebidas a base de vegetales, a la temperatura máxima de trabajo (65°C) se alcanza una reducción superior a cinco ciclos logarítmicos para tiempos inferiores de 1 min para el caso del pH a 4.25 y 4.75 (FIGURA 1 y 2); en el pH a, 5.20, no se detectan células viables a partir de un tiempo de exposición de 1.3 min (FIGURA 3). Esta diferencia podría deberse al efecto combinado de la temperatura y pH en la variación del tiempo de exposición que debe aplicarse para lograr reducciones significativas de la población inicial de microorganismos presentes.

Por otro lado, las curvas de inactivación obtenidas difieren de la forma lineal, es notable la presencia de hombros y colas en los diferentes niveles temperatura y pH (FIGURA 1, 2 y 3).



**FIGURA 1.** Curvas de supervivencia de *L. innocua* para las temperaturas de 50°C ○ ; 55 °C \*; 60 °C △; y 65 °C × para el pH de 4.25.



**FIGURA 2.** Curvas de supervivencia de *L. innocua* para las temperaturas de 50°C ○ ; 55 °C \*; 60 °C △; y 65 °C × para el pH de 4.75.

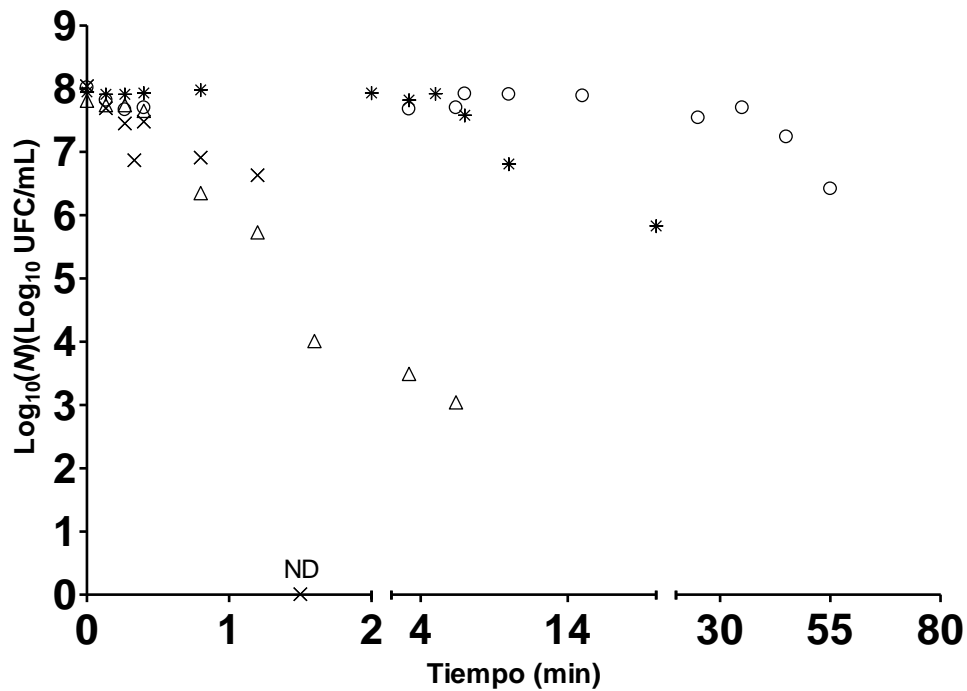


FIGURA 3. Curvas de supervivencia de *L. innocua* para las temperaturas de 50°C ○; 55 °C \*; 60 °C △; y 65 °C × para el pH de 5.20.

### Ajuste de modelos matemáticos

Teniendo en cuenta el tipo de comportamientos observados en las curvas de supervivencia, se propuso la aplicación de cuatro modelos no lineales frecuentemente usados en estudios de inactivación: distribución de frecuencias de Weibull (ecuación 2), modelo Geeraerd (ecuación 3), modelo de Cerf con hombro (ecuación 4), y ecuación modificada de Gompertz (ecuación 5) ((Bhaduri et al. 1991, Linton 1995; Xiong et al. 1999; Chen and Hoover, 2004; Geeraerd et al. 2006; Buzrul et al 2008).

Tras las regresiones no lineales, se obtuvieron distintos valores de los parámetros respectivos de cada modelo para cada nivel de temperatura y pH. En concreto, en la TABLA 1 se exponen los valores obtenidos de los parámetros cinéticos relacionados con la inactivación de microorganismos para cada modelo:  $\delta$  de Weibull,  $k_{max}$  de Geeraerd,  $k_{max1}$  y  $k_{max2}$  de CERF y  $\mu_{max}$  de la ecuación modificada de Gompertz, determinándose diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para cada nivel de temperatura y pH. Sin embargo, únicamente los valores obtenidos de  $\mu_{max}$  de Gompertz presentaron una relación con la temperatura aplicada, en concreto un incremento en su valor a medida que se aumentaba la intensidad de tratamiento (temperatura) para todos los valores de pH.

**TABLA 1.** Parámetros de la distribución de frecuencias de Weibull modelo de Weibull (ecuación 1 y 2), Geeraerd (ecuación 3), CERF (ecuación 4) y ecuación modificada de Gompertz (ecuación 6).

pH	T [°C]	WEIBULL	GEERAERD	CERF CON HOMBRO		ECUACIÓN MODIFICADA GOMPERTZ
		$\delta \pm \sigma^{(a)}$ [min*mL/UFC]	$k_{\max} \pm \sigma^{(a)}$ [UFC/mL min]	$k_{\max1} \pm \sigma^{(a)}$ [UFC/mL min]	$k_{\max2} \pm \sigma^{(a)}$ [UFC/mL min]	$\mu_{\max} \pm \sigma^{(a)}$ [UFC/mL min]
4.25	50	25.538 ± 0.318	0.250 ± 0.006	0.250 ± 0.006	0.250 ± 0.006	0.134 ± 0.007
	55	3.635 ± 0.073	1.802 ± 0.032	1.802 ± 0.032	1.802 ± 0.032	0.873 ± 0.043
	60	0.536 ± 0.030	10.722 ± 0.481	41.988 ± 4.340	9.593 ± 0.915	5.334 ± 0.218
	65	0.119 ± 0.001	30.429 ± 1.100	34.867 ± 1.754	8.342 ± 1.018	16.250 ± 1.374
4.75	50	24.619 ± 0.774	0.294 ± 0.019	0.389 ± 0.167	0.206 ± 0.153	0.178 ± 0.011
	55	5.347 ± 0.258	1.246 ± 0.045	1.246 ± 0.045	1.246 ± 0.045	1.433 ± 0.092
	60	0.340 ± 0.028	9.294 ± 0.552	9.069 ± 0.710	0 ± 0.0	4.202 ± 0.450
	65	0.467 ± 0.044	12.237 ± 0.382	17.541 ± 0.600	4.644 ± 0.481	15.581 ± 4.909
5.20	50	51.379 ± 0.858	0.201 ± 0.029	0.201 ± 0.029	0.201 ± 0.029	0.100 ± 0.010
	55	11.249 ± 0.117	0.457 ± 0.214	0.326 ± 0.014	0.326 ± 0.014	0.283 ± 0.049
	60	0.086 ± 0.002	7.123 ± 0.337	7.135 ± 0.318	0.363 ± 0.059	3.226 ± 0.189
	65	0.564 ± 0.158	2.013 ± 0.966	11.560 ± 3.692	1.537 ± 0.384	7.094 ± 1.379

(a)  $\sigma$ , desviación estándar.

### Bondad del ajuste

El ajuste de las funciones no lineales fue evaluado con el  $R^2_c$  (ecuación 7) y  $RMS$  (ecuación 8). Los coeficientes de determinación obtenidos son representativos a un 90% en todos los casos, a excepción de la temperatura de 50°C para el pH de 4.75 y la temperatura de 65 °C para el pH de 5.20, los cuales son representativos a un 80%.. De acuerdo a los valores obtenidos, la mejor bondad de ajuste fue la obtenida por la Ecuación Modificada de Gompertz, seguido de Geeraerd, CERF, y por último, Weibull, respectivamente para cada nivel de pH, como se indica en la TABLA 2.

**TABLA 2.** Comparación de la bondad de ajuste obtenida para el modelo de Weibull (ecuación 2), Geeraerd (ecuación 3), CERF (ecuación 4) y ecuación modificada de Gompertz (ecuación 5).

pH	T (°C)	WEIBULL		GEERAERD		CERF CON HOMBRO		ECUACIÓN MODIFICADA GOMPERTZ	
		$RMS^{(a)}$	$R^2_c^{(b)}$	$RMS^{(a)}$	$R^2_c^{(b)}$	$RMS^{(a)}$	$R^2_c^{(b)}$	$RMS^{(a)}$	$R^2_c^{(b)}$
<b>4.25</b>	50	0.354	0.966	0.229	0.986	0.235	0.985	0.195	0.990
	55	0.170	0.991	0.183	0.990	0.187	0.990	0.161	0.992
	60	0.226	0.985	0.203	0.988	0.492	0.893	0.175	0.991
	65	0.422	0.933	0.379	0.946	0.309	0.964	0.298	0.967
	<b>Promedio</b>	<b>0.293</b>	<b>0.969</b>	<b>0.248</b>	<b>0.978</b>	<b>0.306</b>	<b>0.958</b>	<b>0.207</b>	<b>0.985</b>
<b>4.75</b>	50	0.169	0.642*	0.170	0.639*	0.166	0.650*	0.140	0.752*
	55	0.309	0.964	0.256	0.975	0.261	0.974	0.108	0.996
	60	0.291	0.954	0.156	0.983	0.174	0.979	0.177	0.979
	65	0.908	0.770*	0.272	0.979	0.177	0.991	0.183	0.990
	<b>Promedio</b>	<b>0.419</b>	<b>0.832</b>	<b>0.213</b>	<b>0.894</b>	<b>0.195</b>	<b>0.899</b>	<b>0.152</b>	<b>0.929</b>
<b>5.20</b>	50	0.133	0.910	0.139	0.903	0.142	0.899	0.121	0.917
	55	0.178	0.918	0.155	0.935	0.177	0.919	0.106	0.971
	60	0.657	0.864	0.224	0.984	0.208	0.986	0.248	0.980
	65	0.221	0.745*	0.223	0.741*	0.225	0.736*	0.310	0.975
	<b>Promedio</b>	<b>0.297</b>	<b>0.859</b>	<b>0.185</b>	<b>0.891</b>	<b>0.188</b>	<b>0.885</b>	<b>0.196</b>	<b>0.961</b>

<sup>(a)</sup>  $RMS$ , desviación estándar de los residuales.

<sup>(b)</sup>  $R^2_c$ , coeficiente de determinación corregido.

\* Únicos valores representativos al 80%, el resto a partir del 90%.

### Validación de modelos

Para evaluar la capacidad de un modelo para predecir la respuesta de los microorganismos bajo ciertas condiciones del entorno (McMeekin et al., 1993), Ross (1996) propuso una serie de cálculos para este propósito. La validación de los modelos matemáticos se ha llevado a cabo mediante el cálculo del factor de ajuste ( $A_f$ ), (ecuación 9) y el factor de exactitud ( $B_f$ ) (ecuación 10). Para este propósito se reservó una serie de datos experimentales no utilizados en las regresiones y se comparó con los valores predichos respectivos de cada modelo matemático. Los valores obtenidos para cada nivel de temperatura y pH se muestran en la TABLA 3.

El factor de ajuste nos indica por cuánto las predicciones difieren de los datos observados, en concreto la ecuación modificada de Gompertz presenta un error mínimo en la predicción, a diferencia de los demás modelos. En cuanto al factor de exactitud ( $B_f$ ), nos dice si un modelo es seguro al predecir la respuesta de la inactivación bacteriana. Un modelo considerado como seguro debe tener un valor de  $B_f \leq 1$ . De todos los modelos evaluados, en promedio, el modelo de Gompertz es el modelo más conveniente y seguro a los tres niveles de pH, seguido por el de Geeraerd.

**TABLA 3.** Validación de modelos matemáticos con el cálculo de los estadísticos de  $A_f$  y  $B_f$  (Ross, 1996).

pH	T (°C)	WEIBULL		GEERAERD		CERF CON HOMBRO		ECUACIÓN MODIFICADA GOMPERTZ	
		$A_f^{(a)}$	$B_f^{(b)}$	$A_f^{(a)}$	$B_f^{(b)}$	$A_f^{(a)}$	$B_f^{(b)}$	$A_f^{(a)}$	$B_f^{(b)}$
<b>4.25</b>	45	1.020	0.990	1.031	0.993	1.022	0.990	1.025	0.994
	50	1.023	0.998	1.014	0.999	1.014	0.999	1.016	0.997
	55	1.034	1.016	1.036	1.000	1.065	1.047	1.018	1.002
	60	1.114	1.016	1.138	1.008	1.094	1.030	1.072	1.009
	<b>Promedio</b>	<b>1.048</b>	<b>1.005</b>	<b>1.055</b>	<b>1.000</b>	<b>1.049</b>	<b>1.017</b>	<b>1.033</b>	<b>1.000</b>
<b>4.75</b>	45	1.025	0.986	1.022	0.984	1.022	0.984	1.020	0.992
	50	1.022	1.000	1.022	1.007	1.022	1.007	1.020	1.000
	55	1.031	1.006	1.028	0.999	1.028	0.999	1.032	0.997
	60	1.025	1.005	1.013	1.002	1.014	1.002	1.084	0.934
	<b>Promedio</b>	<b>1.026</b>	<b>0.999</b>	<b>1.021</b>	<b>0.998</b>	<b>1.022</b>	<b>0.998</b>	<b>1.039</b>	<b>0.981</b>
<b>5.20</b>	45	1.016	0.997	1.016	0.997	1.016	0.997	1.017	0.996
	50	1.029	1.003	1.022	1.004	1.023	1.004	1.021	1.005
	55	1.020	0.988	1.019	0.988	1.019	0.988	1.018	0.988
	60	1.060	1.018	1.056	1.011	1.055	1.010	1.044	1.011
	<b>Promedio</b>	<b>1.031</b>	<b>1.002</b>	<b>1.028</b>	<b>1.000</b>	<b>1.028</b>	<b>1.000</b>	<b>1.025</b>	<b>1.000</b>

(a)  $A_f$ , factor de ajuste

(b)  $B_f$ , factor de exactitud

### Estimación del parámetro cinético secundario $z_{(T)}$

Tradicionalmente en los tratamientos por calor, la determinación del parámetro cinético secundario ( $z_{(T)}$ ), nos dice el incremento de temperatura necesaria para disminuir un ciclo logarítmico del parámetro cinético primario. Basándose en la relación lineal entre logaritmo decimal del parámetro cinético primario y la temperatura, es posible determinar el valor del parámetro cinético secundario ( $z_{(T)}$ ) a través del valor inverso de la pendiente. Este valor determina la resistencia a la temperatura del parámetro cinético primario.

De los modelos matemáticos evaluados en la sección anterior, el modelo de Gompertz, es el más adecuado para describir las curvas de inactivación de *L. innocua*. Como se mencionó anteriormente los valores de los parámetros cinéticos ( $\mu_{max}$ ) incrementaban al aumentar la intensidad del tratamiento para cada nivel de pH (TABLA 1). Con la relación lineal entre el logaritmo decimal de  $\mu_{max}$  frente a la temperatura fue posible determinar los valores de ( $z_{(T)}$ ) para cada nivel de pH. Los coeficientes de determinación obtenidos por cada relación lineal son representativos en un 95%. Los valores de ( $z_{(T)}$ ) para cada pH se muestran a continuación:

Para *Listeria innocua* ( $50 \leq T \leq 65$ ),

$$\text{Log}_{10}(\mu_{max})_{\text{pH}=4.25} = 0.1407T - 7.8369; R^2=0.9877 \quad (11)$$

$$Z_{(T) \text{ pH}=4.25} = 1/m = 7.11 \text{ (}^\circ\text{C)} \quad (12)$$

$$\text{Log}_{10}(\mu_{\max})_{\text{pH}=4.75} = 0.1258T - 6.9284; R^2=0.9789 \quad (13)$$

$$Z_{(T) \text{ pH}=4.75} = 1/m = 7.95 \text{ (}^\circ\text{C)} \quad (14)$$

$$\text{Log}_{10}(\mu_{\max})_{\text{pH}=5.20} = 0.1323T - 7.6547; R^2=0.9604 \quad (15)$$

$$Z_{(T) \text{ pH}=5.20} = 1/m = 7.56 \text{ (}^\circ\text{C)} \quad (16)$$

## CONCLUSIONES

En respuesta a los límites establecidos por la FDA (2003) y NACMCF (2006) para este tipo de productos, el presente estudio ha hecho uso de herramientas de la microbiología predictiva para definir un modelo cinético que describa las curvas de inactivación tras tratamientos térmicos de *L. innocua* CECT 910 inoculada en una bebida mezcla de vegetales a tres niveles de pH (4.25, 4.75 y 5.20).

Las curvas de supervivencia obtenidas difieren de la forma lineal. Por ello el ajuste se realizó con modelos matemáticos no-lineales frecuentemente usados en estudios de inactivación: modelo de Weibull, modelo de Geeraerd, modelo de Cerf con hombro y ecuación modificada de Gompertz. Este último es el que presentó la mejor bondad de ajuste y validación, por lo que es considerado como un modelo predictivo adecuado para describir las curvas de inactivación de *L. innocua* posibilitando la determinación de los valores de ( $z_{(T)}$ ) de 7.11, 7.95 y 7.56°C en la bebida de vegetales para cada nivel de pH (4.25, 4.75 y 5.20), respectivamente.

## REFERENCIAS

- Adams, M.R. and Moss, M.O. 1997. *Food Microbiology*. Royal Society of Chemistry. Cambridge.
- Bhaduri, S., Smith, P. W., Palumbo, S. A, Turner-Jones C. O., Smith, J. L. , Marmer, B. S., Buchanan, R. L., Zaika, L. L., Williams, A. C. 1991. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in liver sausage slurry. *Food Microbiology*. **8**:75-78.
- Baranyi, J., and Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* **23**:277-294.
- Buzrul, S., Alpas, H. 2004. Modeling the synergistic effect of high pressure and heat on inactivation kinetics of *Listeria innocua*: a preliminary study. *FEMS Microbiol. Lett.* **238**:29-36.
- Buzrul, S., Alpas, H., Largueteau A. and Demazeau G. (2008). Modeling high pressure inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in whole milk. *Eur. Food Res. Technol.* **227**(2): 443-448.
- Casolari, A. 1988. Microbial death. In: Brazin M. J., Prosser J. I. (Eds.), *Physiological models in Microbiology 2*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-44.
- Cerf, O., 1977. A Review. Tailing of survival curves of bacterial spores. *J. Appl. Microbiol.* **42**:1-19.

- Chen, H., and Hoover, D. G. (2004). Use a Weibull model to describe and predict pressure inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. *Innovate Food Science and Emerging Technologies*. **5**:269-276.
- Corradini, M. G., and Peleg, M., 2003. A model of microbial survival curves in water treated with a volatile disinfectant. *J. Appl. Microbiol.* **95**:1268–1276.
- Geeraerd, A. H., Herremans, C. H., and Van Impe, J. F. 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *Int. J. Food Microbiol.* **59**:185–209.
- Geeraerd, A. H., Valdramidis, J. F. and Van Impe, J. F. (2005). GlnaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *Int. J. Food. Microbiol.* **102**:95-105.
- Gibson, A.M., Bratchell, N., Roberts, T.A. 1987. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *J. Appl. Bacteriol.* **62**:479-90.
- Hajmeer, M., I. Basheer, C., Hew, and Cliver, D. O. 2006. Modeling the survival of *Salmonella* spp. in chorizos. *Int. J. Food Microbiol.* **107**:59–67.
- Kamau, D. N., Doores, S., Pruitt, K. M. 1990. Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by lactoperoxidase system. *Appl. Environ. Microbiol.* **56(9)**:2711-2716.
- Linton, R. H., Carter, W. H., Pierson, M. D. and Hackney, C. R. (1995). Use of a modified Gompertz equation to model nonlinear survival curves for *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Prot.* **58**:946-954.
- Linton, R. H., Carte, r W. H., Pierson, M. D., Hackney, C. R. and Eifert, J. D. (1996). Use of a modified Gompertz equation to predict the effects of temperature, pH, and NaCl on the inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A heated in infant formula. *J. Food Prot.* **59**:16-23.
- Ly-Nguyen, B., Van Loey, A. M., Scout, C., Eren Özcan, S., Fachin, D., Verlent, I., Vu T. S., Duvetter, T., Hendrickx, M. E. (2003). Mild-heat and high-pressure inactivation of carrot pectin methylesterase: A kinetic study. *J. Food Sci.* **68(4)**:1377-1383.
- Mafart, P., Couvert O., Gaillard, S., Leguerinel, I. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *Int. J. Food Microbiol.* **72**:107-113.
- McMeekin, T. A.; Olley, J., Ross, T. and Ratkowsky, D. A. (1993). Basic concepts and methods. *Predictive Microbiology: Theory and Application*. New York: John Wiley & Sons. pp. 11-70.
- Mossel, D. A. A., Corry, J. E. L., Struijk, C. B., Baird, R. M. 1995. Essentials of the Microbiology Foods. John Wiley & Sons, West Sussex.
- Murphy, R., Y., Duncan, L. K., Johnson, E. R., Davis M. D., and Smith, J. N. 2002. Thermal Inactivation D- and z-Values of *Salmonella* Serotypes and *Listeria innocua* in Chicken Patties, Chicken Tenders, Franks, Beef Patties, and Blended Beef and Turkey Patties. *J. Food Protect.* **65(1)**: 53-60.
- [NACMCF] National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, Recommendations for fresh juices. (1997). *National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, U. S. Department of Agriculture*, Washington, D. C. (April 9, 1997, accessed January, 2008).
- [NACMCF] National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, Requisite scientific parameters for establishing equivalence of alternative methods of pasteurization. (2006). *J. Food Prot.* **69(5)**:1190-1216.
- Peleg, M. and Cole, M. B. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. Artículo de revisión. *Food Sci. Nutr.* **38**:353-380.
- Reyns, K. M. F. A., Soontjens, C. C. F., Cornelis, K., Weemaes, C. A., Hendrickx, M. E. and Michielis, C. W. (2000). Kinetic analysis and modeling of combined high-pressure-temperature inactivation of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *Int. J. Food Microbiol.* **56**:199-210.
- Ross, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J. Appl. Bacteriol.* **81**:501-508.
- Skandamis, P.N., Nichas, G.E., 2000. Development and Evaluation of a Model Predicting the Survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in Homemade Eggplant Salad at



- Various Temperatures, pHs, and Oregano Essential Oil Concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, **66(4)**:1646–1653.
- Steinmetz, K.A., Potter, J.D. 1996. Vegetables, fruit, and cancer prevention: review. *Journal of the American Dietetic Association*, **96(10)**:1027-1039.
- [USFDA] U.S. Food and Drug Administration. 2000. Kinetics of microbial inactivation for alternative Food Processing Technologies. Center for Food and Safety and Applied Nutrition. Dirección URL: <<http://www.fda.gov>>. [Consulta: 10 Oct. 2008].
- U.S. Food and Drug Administration (FDA). 2003. The Juice HACCP Regulation. Dirección URL: <<http://www.cfsan.fda.gov>>. [Consulta: 25 Oct. 2008].
- Van Boekel, M. A. J. S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *Int. J. Food Microbiol.* **74**:139-159.
- Virto, R., D. Sanz, I. Alvarez, Condon, and Raso, J. 2005. Inactivation kinetics of *Yersinia enterocolitica* by citric and lactic acid at different temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* **103**:251.
- Xiong, R., Xie, G., Edmondson, A. S., Linton, R. H. and Sheard, M. A. (1999a). Comparison of the Baranyi model with the modified Gompertz equation for modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A, *Food Microbiol.* **16**:269-279.
- Xiong, R., Xie, G., Edmondson, A. S., and Sheard, M. A. (1999b). A mathematical model for bacterial inactivation. *Int. J. Food. Microbiol.* **46**:45:35.