



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



**DETERMINACIÓN DE CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN DE
ESCHERICHIA COLI CECT 433 INOCULADA EN MEDIO DE
REFERENCIA POR TRATAMIENTOS CON ALTAS
PRESIONES HIDROSTÁTICAS**

**Ajuste a un modelo matemático, predicción y validación de
un modelo experimental no-lineal.**

TESIS MASTER EN GESTIÓN Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

Nombre alumno. Samuel Lima Jácome

Director/a. Antonio López Martínez¹

M^a Dolores Rodrigo Aliaga²

Tutor/a. Daniela Saucedo Reyes

Centro. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos

^{1 y 2} Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, C.S.I.C., P.O. Caja 73, 46100
Burjassot, Valencia, España

RESUMEN

Se han determinado cinéticas de inactivación de *E. coli* CECT 433 por altas presiones hidrostáticas inoculada en caldo nutriente (pH 7,4±0,2), para un rango de presiones de 150, 175, 200 y 225 MPa con tiempos de exposición de 0 a 14 minutos y temperatura constante de 25°C. Las curvas de supervivencia se ajustaron a tres modelos matemáticos: Weibull, Baranyi y Gompertz. La mejor bondad de ajuste fue el obtenido por la ecuación modificada de Gompertz siendo los valores de $R^2_C = 0,990$, un $RMSE = 0,138$. La validación de los modelos matemáticos fue a través del cálculo de factor de ajuste y exactitud (A_f y B_f), siendo mejor el modelo de Gompertz. Finalmente, se determinó el parámetro cinético secundario (Z (P)) o constante de resistencia a presión, respectivo a cada modelo, en concreto dicho valor determinado por el modelo de Gompertz resultó de 125 MPa.

ABSTRACT

It has been determined inactivation kinetics of *E. coli* CECT 433 by high hydrostatic pressure inoculated in nutrient broth (pH 7.4 ± 0.2), for a range of pressures of 150, 175, 200 and 225 MPa with exposure times of 0 to 14 minutes, and 30°C. The survival curves were adjusted to three mathematical models: Weibull, Baranyi and Gompertz. The best goodness of fit was obtained for the modified Gompertz equation with of values $R^2_C = 0990$, and $RMSE = 0138$. The validation of mathematical modeling was done through calculating accuracy and bias factor (A_f and B_f), being the best Gompertz model. Finally, it was determined the secondary kinetic parameter (Z (P)) or constant resistance to pressure, for each model, specifically the value determined by the Gompertz model resulted in 125 MPa.

RESUME

S'han determinat cinètiques d'inactivació de *E. coli* CECT 433 utilitzant altes pressions hidrostàtiques, inoculant en caldo nutritiu (pH 7,4±0,2), en un interval de pressions de 150, 175, 200 y 225 MPa amb temps d'exposició de 0 a 14 minuts. Les curves de supervivència es van ajustar a 3 models matemàtics: Weibull, Baranyi i Gompertz. La millor bondat d'ajust es va obtindre amb l'equació modificada de Gompertz amb valors de $R^2_C = 0990$ i $RMSE = 0138$. La validació dels models matemàtics es va fer mitjançant el càlcul del factor d'ajust i d'exactitud (A_f i B_f) resultant millor el model de Gompertz. Finalment, es va determinar el paràmetre cinètic secundari (Z (P)) o constant de resistència a la pressió, respectiu per a cada model, en concret el valor determinat utilitzant el model de Gompertz resultà de 125 MPa.

PALABRAS CLAVE. Cinéticas de inactivación, *Escherichia coli*, altas presiones hidrostáticas (APH), microbiología predictiva.

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente el método más utilizado para la conservación de alimentos ha sido el tratamiento térmico. La utilización de la temperatura como principal mecanismo en la reducción de la actividad de agua de los alimentos y como consecuencia la inhibición del desarrollo microbiológico data de más de 5000 años.

La necesidad de crear y fomentar alternativas al tratamiento térmico con vista a conseguir una mejor calidad organoléptica de los productos procesados, es el principal motivo por lo que se está estudiando tecnologías emergentes de conservación, como las altas presiones hidrostáticas.

La Alta Presión Hidrostática (APH) es una técnica física no térmica que está siendo investigada para el procesamiento mínimo de alimentos y se está utilizando por la industria para el procesamiento de algunos alimentos como alternativa a la pasteurización térmica, ya que, inactiva e inhibe el desarrollo de microorganismos y enzimas degradantes, provocando un efecto perjudicial mínimo sobre la calidad sensorial de los alimentos (Chen y Hoover, 2003).

Las APH actúan instantánea e uniformemente a través de la masa del alimento independientemente de su tamaño, forma o composición, esto se debe a que la tecnología está basada en dos principios básicos (USFDA, 2000):

1. Principio de *Le Chatelier*: Todo fenómeno que se acompaña de una disminución de volumen se ve acelerado por un aumento en la presión.
2. Principio de *Pascal*: La presión aplicada en un punto de un líquido contenido en un recipiente se transmite con el mismo valor a cada una de las partes del mismo.

Así, podemos describir la presión hidrostática como la fuerza por unidad de área que ejerce un líquido en reposo sobre las paredes del recipiente que lo contiene y sobre cualquier cuerpo que se encuentre sumergido.

Desde la década de los 90, el mercado japonés introdujo productos procesados por esta tecnología, y actualmente se está aplicando, entre otros, a los productos a base de frutas, ya que se asegura su pasteurización debido a la alta acidez de los productos (pH 3 – 4) que desfavorecen el desarrollo de bacterias patógenas siendo también un modo de tratamiento con potencialidad por su mejor retención del sabor y aroma de la fruta.

Dentro del campo de la inocuidad y seguridad alimentaria, existe la necesidad de describir el comportamiento microbiano ya sea en medios de referencia o en los propios alimentos cuando es sometido a diversas condiciones de presión, pulsos eléctricos o cualquier otra tecnología

emergente; combinada o no con calor u otros factores de estrés como pH, actividad de agua, concentración de sal, antimicrobianos, etc. pues su comportamiento es distinto (USFDA, 2000). La microbiología predictiva, el campo de estudio que combina elementos de microbiología, matemáticas y estadística, se encarga de desarrollar modelos que permita hacer predicciones en crecimiento o muerte de microorganismos cuando son sometidos a diferentes condiciones ambientales (Linton, 1995).

Inicialmente relaciones matemáticas lineales fueron usadas para describir cinéticas de inactivación tras tratamientos térmicos, determinándose parámetros primarios como el tiempo de reducción decimal (valor D) que es el tiempo necesario para la reducción de 1 ciclo logarítmico en la fracción de supervivientes. La influencia de la temperatura en la muerte celular viene determinada por la constante de resistencia térmica (z (T)), parámetro cinético secundario, definido como la temperatura necesaria para la reducción de un ciclo logarítmico en el valor de D . Poblaciones microbianas con parámetros cinéticos más resistentes a los cambios de temperatura son descritas por un mayor valor de z (T). Los ejemplos más evidentes son el mayor valor de z (T) de las esporas en comparación con células vegetativas (USFDA, 2000).

Actualmente, se ha observado que la obtención de cinéticas de inactivación tanto por tratamientos térmicos como en altas presiones, no siguen una cinética de primer orden (Pérez et al., 2007). Por tanto, la definición de curvas de supervivencia con modelos lineales ya no supone una descripción exacta de la realidad (USFDA, 2000), es por ello, que existe la necesidad de ajustar los datos experimentales a modelos no-lineales y determinar parámetros cinéticos primarios y secundarios, similares al valor de D y z , del modelo tradicional de tiempo de muerte térmica (Yamamoto et al., 2005). Existen estudios más recientes en los que ya se emplean diversos modelos matemáticos alternativos para describir estas curvas no lineales (Chen y Hoover, 2003; Chen y Hoover, 2004; Erkmen y Dogan, 2004; Yamamoto et al., 2005; Koseki y Yamamoto, 2007; Pina Pérez et al., 2007; Buzrul et al., 2008).

La determinación de estas constantes cinéticas proporciona información esencial para la evaluación del riesgo microbiológico en alimentos estando íntimamente relacionada con la evaluación de la exposición, además, permite a la industria controlar la seguridad de sus procesos conservación por esta tecnología. (NACMCF, 2006).

Por ende, el objetivo del presente trabajo se dirige hacia el estudio del efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre la inactivación de *E. coli* CECT 433 en medio de referencia, ajustar las curvas de supervivencia a tres modelos no-lineales, la distribución de frecuencia de Weibull, el modelo de Baranyi, y la ecuación modificada de Gompertz; establecer parámetros cinéticos, comparar la bondad del ajuste, desarrollar y validar un modelo secundario que prediga la fracción de supervivientes en función de la presión y el tiempo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del cultivo de células madre.

La muestra liofilizada de *E. coli* CECT 433 fue proporcionada por la Colección Española de Cultivos Tipo. Para su rehidratación se transfirió a 10 mL de caldo nutriente (NB) (Scharlab Chemie S. A., Barcelona, España). Después de 30 minutos, 5 mL del cultivo se inocularon en 100 mL de NB y se incubaron a 37° C bajo agitación continua (200 rpm) durante 30 minutos. Cuarenta mL del cultivo resultante se transfirieron a 400 mL de NB y se incubaron durante 8 h a la misma temperatura y condiciones de agitación. Las células fueron centrifugadas dos veces a 3826 x g durante 15 min a 4°C y resuspendidas en NB. Después de la segunda centrifugación, las células se resuspendieron en 30 mL de NB con un 20% de glicerol y se depositaron en crioviales de plástico estériles de 2 mL. Las muestras de 2 mL fueron inmediatamente almacenadas a -80°C hasta que se necesitaron. La concentración aproximada fue de 1.56×10^9 UFC/mL.

Preparación del cultivo para estudios de inactivación

Para la obtención del cultivo, un vial de los anteriormente descritos se descongeló, y 1 mL se inoculó en un matraz con 300 mL de NB, se mantuvo a 37°C a 200 rpm por 12 h obteniéndose células en fase de crecimiento estacionaria. Pasado este tiempo, las células fueron centrifugadas dos veces a 3826 x g durante 15 min a 4° C, y resuspendidas en NB. Después de la segunda centrifugación las células se resuspendieron en 80 mL de NB con un 20% de glicerol y se depositaron en crioviales de plástico estériles de 2 mL. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta que se necesitaron para los estudios de cinéticas de inactivación. La concentración estimada fue de 1.73×10^9 UFC/mL.

Tratamiento por APH

Previo a los estudios de inactivación, se descongeló un vial de los descritos anteriormente y se inoculó 1 mL del cultivo en 9 mL de NB. La muestra se introdujo en 3 tubos Eppendorf de 1.5 mL completamente llenos. Los viales se depositaron en bolsas de polietileno llenas de agua y se sellaron térmicamente (Thermosealer MULTIVAC), antes de ser introducidos en el equipo de APH (High Pressure Food Processor; EPSI, Belgium). La

vasija contendora de la presión hidrostática (diámetro interno de 100 mm y altura de 300 mm) está rodeada de una doble cámara por la que fluye el líquido refrigerante y que la mantiene a la temperatura de trabajo deseada. El líquido de presurización es una mezcla de agua y glicol. El nivel de presión, el tiempo de presurización y la temperatura son controlados automáticamente. La velocidad del incremento de la presión es de 300 MPa/min y el tiempo de despresurización es menor a 1 min. El tiempo de tratamiento descrito en este estudio no incluye los tiempos de subida y bajada de presión. Las células se presurizaron a 150, 175, 200 y 225 MPa a tiempos específicos comprendidos entre 0 y 14 min. Todos los tratamientos se dieron por triplicado y no llegaron a sobrepasar la temperatura de 30°C. Inmediatamente después de la presurización las muestras fueron transferidas a un baño con agua fría y usadas para la enumeración de unidades formadoras de colonias (UFC). La suspensión de células sin presurizar fue enumerada 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 al 0.1% (Scharlab Chemie S. A.). El medio usado para la enumeración de células viables fue agar de recuento en placa (PCA) (Scharlab Chemie S. A.). Las diluciones seleccionadas fueron incubadas a 37°C durante 24 h. La reducción de células viables se expresó como el logaritmo decimal del cociente entre las células tratadas y no tratadas.

Análisis estadístico

Para evaluar los efectos del tiempo y la intensidad de la presión en la inactivación microbiana de *E. coli* CECT 433, 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 fueron ajustadas a los siguientes modelos:

DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DE WEIBULL

La forma acumulativa de la distribución de Weibull es la siguiente:

$$\text{Log}_{10} \frac{N}{N_0} = -bt^n \quad (1)$$

Donde: N_0 y N corresponden a la concentración inicial y final de células; b y n son los factores de escala y forma respectivamente.

La distribución de Weibull corresponde a una curva cóncava, hacia arriba, si $n < 1$, una curva convexa, hacia abajo, si $n > 1$, y lineal si $n = 1$ (Peleg y Cole, 1998).

MODELO DE BARANYI

Esta ecuación se desarrolló originalmente para curvas de crecimiento (Baranyi et al., 1993; Baranyi y Roberts, 1994). Xiong et al. (1999) utilizaron la ecuación 2 y la variable $B(t)$ descrita por la ecuación 3 para describir curvas de supervivencia de *L. monocytogenes* Scott A, tras recibir un tratamiento térmico, efectuando en la fórmula empírica una serie de transformaciones quedando la ecuación como se sigue:

$$\text{Log}_{10} \frac{N}{N_0} = \text{Log}_{10}(q_B - (1 - q_B)e^{-k_{\max}(t - B(t))}) \quad (2)$$

siendo $B(t)$,

$$B(t) = \frac{r}{3} \left(\frac{1}{2} \ln \frac{(r+t)^2}{r^2 + rt - t^2} + \sqrt{3} \arctan \frac{2t-r}{r\sqrt{3}} + \sqrt{3} \arctan \frac{1}{\sqrt{3}} \right) \quad (3)$$

donde: N_0 y N corresponden a la concentración inicial y final de células; q_B describe el segmento de cola, k_{\max} es la velocidad máxima de muerte

relativa; t es el tiempo de tratamiento; y r es el tiempo requerido para que la velocidad de muerte relativa alcance la mitad de k_{max} ; $q_B=(N_{min}/N_0)$, donde N_{min} es la mínima concentración de células remanentes en la fase de cola. Cuando $N_{min}=0$, significa que no hay fase de cola. El q_B evita el efecto que pudiera tener el uso de distintos valores de N_0 .

ECUACIÓN MODIFICADA DE GOMPERTZ

La efectividad de la ecuación de modificada de Gompertz (ecuación 4), originalmente diseñada para interpretar curvas de crecimiento, fue demostrada por Linton et al., (1995, 1996) tras estudiar curvas de supervivencia no-lineales de *L. monocytogenes* Scott A por tratamientos térmicos a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Log}_{10} \frac{N}{N_0} = C e^{-e^{-BM}} - C e^{-e^{-B(t-M)}} \quad (4)$$

donde: N_0 y N corresponden a la concentración inicial y final de células; C es la diferencia entre el valor más alto y más bajo de la asíntota y el signo menos significa inactivación de microorganismos; B es la velocidad de muerte relativa a tiempo de M , siendo M el tiempo en el cual la velocidad de muerte es máxima.

Comparación de modelos

Los datos experimentales se ajustaron mediante regresiones no lineales a los modelos matemáticos expuestos anteriormente. La bondad de ajuste de los datos experimentales a los modelos se realizó mediante el cálculo de R^2 corregido (ecuación 5) y RMS (ecuación 6):

$$R_c^2 = \left(1 - \frac{(m-1) \left(1 - \frac{SSQ_{regresion}}{SSQ_{total}} \right)}{m-j} \right) \quad (5)$$

$$RMS = SD = \sqrt{\frac{SSQ_{residual}}{m - j}} \quad (6)$$

donde: m es el número de observaciones, j es el número de parámetros del modelo, SSQ es el promedio de 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 grupo de datos experimentales seleccionados aleatoriamente y reservados para éste propósito:

$$A_f = 10^{\frac{\sum |Log(X_p / X_o)|}{n}} \quad (7)$$

$$B_f = 10^{\frac{\sum Log(X_p / X_o)}{n}} \quad (8)$$

donde: n es el número de total de observaciones; X_p es el valor de predicho por los modelos de ciclos logarítmicos inactivados, y X_o es el valor observado o experimental.

RESULTADOS

Procesamiento de los datos experimentales

Para los estudios de inactivación, los datos experimentales se dividieron de forma aleatoria en cuatro grupos, tres de ellos se emplearon para el ajuste a los modelos matemáticos y el último se reservó para ser utilizado en el apartado de validación.

Análisis de las curvas de inactivación

El logaritmo decimal de la fracción de supervivientes de las células de *E. coli* CECT 433 se representó frente al tiempo a 4 niveles de presión específicos (150, 175, 200, 225 MPa) (Figura 1). Se observó que a medida que aumentaba el nivel de presión aplicado y el tiempo de exposición, incrementaba la inactivación conseguida. Tras un análisis de la varianza se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los logaritmos de la fracción de supervivientes para cada tiempo y para cada nivel de presión con un nivel de confianza del 95%. La máxima inactivación alcanzada fue de aproximadamente 6 ciclos logarítmicos a una presión de 225 MPa y 14 min de exposición.

Las curvas de inactivación obtenidas difieren de la forma lineal, se observan fenómenos de cola para cada nivel de presión (Figura 1), dicha forma no-lineal es comúnmente observada en estudios de inactivación por presión de *E. coli* en diferentes sustratos (Yamamoto et al., 2005; Buzrul et al., 2008), la explicación física de este fenómeno es definida como la presencia de células remanentes después del tratamiento.

Análisis de los parámetros de los modelos matemáticos propuestos

En base al tipo de comportamiento observado en las curvas de supervivencia, se propuso la aplicación de tres modelos no-lineales frecuentemente usados en estudios de inactivación por presión: distribución de frecuencias de Weibull (ecuación 1), modelo de Baranyi (ecuación 2 con valor de $B(t)$ descrito por la ecuación 3) y ecuación modificada de Gompertz (ecuación 4) (Chen y Hoover, 2003; Chen y Hoover, 2004; Pina Pérez et al., 2007; Buzrul et al., 2008).

Tras las regresiones no lineales se obtuvieron los valores de los parámetros (\pm su desviación estándar) de Weibull, Baranyi y Gompertz, para cada nivel de presión (Tabla 1). Un análisis de varianza determinó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores de los parámetros b y n de Weibull, q_B y k_{max} de Baranyi y C , B , y M de Gompertz para cada nivel de presión y con un nivel de confianza del 95%. El parámetro r de Baranyi no presenta diferencias significativas ($p > 0,05$) entre presiones, este resultado es esperado debido a que dicho parámetro tiende a 0 ya que las curvas de inactivación no presentan hombros (Figura 1).

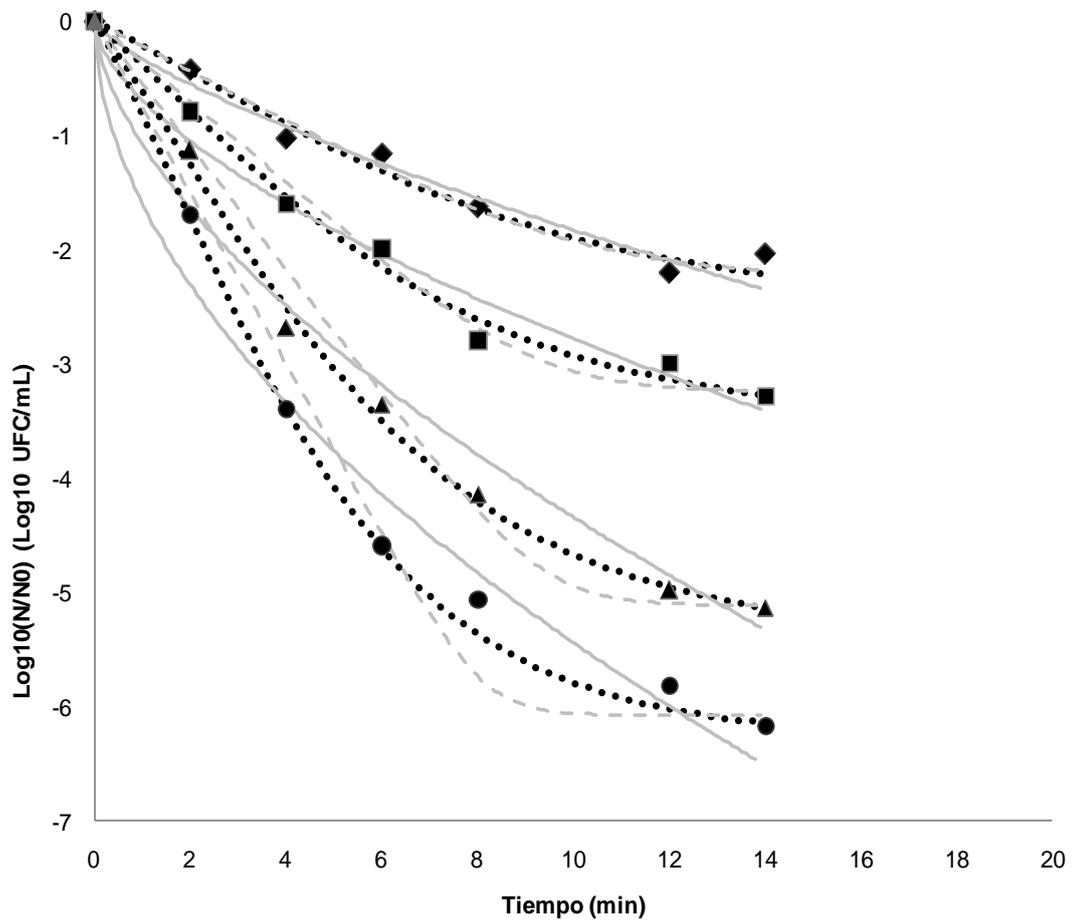


FIGURA 1. Curvas de inactivación de *E. coli* CECT 433 a 150(◆), 175 (■), 200 (▲) y 225(●). Los resultados se expresan en promedio de 3 repeticiones. Ajuste de datos experimentales con Weibull (—), Baranyi (---) y Gompertz (•••).

TABLA 1. Parámetros de la distribución de Weibull (ecuación 1), modelo de Baranyi (ecuación 2 con valor de $B(t)$ descrito por la ecuación 3) y la ecuación modificada de Gompertz (ecuación 4). Los valores de q_B y sus respectivas desviaciones estándares se multiplican por 10^5 .

Presión MPa	D. F. Weibull		M. Baranyi			E. M. Gompertz		
	$b \pm SD$ (Log ₁₀ UFC/mL)min ⁻¹	$n \pm SD$	$q_B \pm SD$	$k_{max} \pm SD$ (Log ₁₀ UFC/mL)min ⁻¹	$r \pm SD$ (min)	$C \pm SD$ Log ₁₀ UFC/mL	$B \pm SD$ (Log ₁₀ UFC/mL)min ⁻¹	$M \pm SD$ (min)
150	0,201±0,001	0,743±0,001	579,633±4,356	0,511±0,001	-0,0002±0,1290	3,1±0,1	0,201±0,001	2,3±0,1
175	0,237±0,001	0,605±0,003	56,280±1,294	0,815±0,003	-0,0590±0,0480	4,6±0,1	0,237±0,001	1,6±0,1
200	0,264±0,004	0,606±0,002	0,775±0,059	1,252±0,014	-0,0001±0,0481	6,7±0,1	0,264±0,004	1,8±0,1
225	0,330±0,001	0,533±0,001	0,084±0,001	1,725±0,008	-0,0001±0,0588	7,5±0,1	0,330±0,001	1,8±0,1

Bondad del ajuste y validación de modelos matemáticos

La evaluación comparativa del ajuste dado por los modelos matemáticos empleados en este estudio fue a través del cálculo del coeficiente de determinación corregido (R^2_c) (ecuación 5) y la desviación estándar de los residuos (RMS) (ecuación 6).

La representación del ajuste proporcionado por cada modelo se puede observar en la figura 1 donde se visualiza que para todas las curvas de inactivación, la ecuación modificada de Gompertz se ajusta mejor a los datos experimentales y, por ende, obtuvo la mejor bondad de ajuste ($R^2_c=0,990$ y $RMS=0,138$), seguido del modelo de Baranyi ($R^2_c=0,982$ y $RMS=0,450$) y finalmente por la distribución de frecuencias de Weibull ($R^2_c=0,964$ y $RMS=0,883$) (Tabla 2).

TABLA 2. Valores estadísticos de R^2_c y $RMSE$ para los 3 modelos propuestos.

Presión (MPa)	F. D. Weibull		M. Baranyi		E. M. Gompertz	
	R^2_c	$RMSE$	R^2_c	$RMSE$	R^2_c	$RMSE$
150	0,963	0,249	0,982	0,122	0,980	0,138
175	0,960	0,608	0,982	0,277	0,985	0,237
200	0,972	0,982	0,983	0,587	0,996	0,126
225	0,961	1,694	0,981	0,815	0,999	0,051
Promedio	0,964	0,883	0,982	0,450	0,990	0,138

Para profundizar y completar la comparación de los modelos se recurrió a la validación a través del cálculo del factor de ajuste (A_f) (ecuación 8) y factor de exactitud (B_f) (ecuación 9). Se utilizó el cuarto grupo de datos (no utilizado en el cálculo de los parámetros cinéticos) y se comparó con los resultados predichos por los modelos. Los valores obtenidos se representan en la Tabla 3. El factor de ajuste, indica cuanto la predicción del modelo difiere de los datos observados y el factor de exactitud indica si los datos predichos se encuentran numéricamente por encima o por debajo de los datos experimentales. Un modelo validado de esta forma se considera como “seguro” cuando el valor de B_f es menor o igual a 1. En concreto, el resultado en promedio de esta prueba sugiere que tanto el modelo de Gompertz como el de Baranyi son seguros siendo el primero más exacto que el segundo (A_f y B_f más cercanos de 1).

TABLA 3. Factor de Ajuste (A_f) y factor de exactitud (B_f) del $\text{Log}_{10} (Nf/N0)$ predichos frente a los observados para cada modelo matemático.

Presión (MPa)	F. D. Weibull		M. Baranyi		E. M. Gompertz	
	A_f	B_f	A_f	B_f	A_f	B_f
150	1,110	1,041	1,068	0,997	1,071	1,010
175	1,088	1,033	1,077	0,965	1,049	1,001
200	1,123	1,053	1,054	0,961	1,044	1,017
225	1,124	1,033	1,077	0,939	1,013	1,001
Promedio	1,111	1,040	1,069	0,965	1,039	0,999

Determinación del parámetro cinético secundario

La determinación de un parámetro cinético secundario (valor de z), permite conocer el grado de resistencia del valor del parámetro cinético primario respecto al factor ambiental expuesto, en este caso presión. Dicho valor es calculado, en tratamientos térmicos, relacionando linealmente el logaritmo decimal del parámetro cinético primario (valor D) frente a la presión, con el valor inverso de la pendiente se obtiene $z(T)$. (Zook et al., 1999)

De los modelos matemáticos empelados en este estudio se consideraron como parámetros cinéticos primarios los siguientes ($150 \geq P \leq 225$):

- Conforme lo indica Chen y Hoover (2004), el parámetro b del modelo de Weibull es considerado como cinético ya que, los valores obtenidos del logaritmo decimal del parámetro b aumentan al aumentar la presión (Tabla 1). Una relación lineal del logaritmo decimal dichos valores frente a la intensidad de tratamiento resulta en la siguiente ecuación:

$$\text{Log}_{10} b = 0,0089 P - 1,7783, R^2 = 0,9758 \quad (9)$$

Por tanto, el valor de z (P) descrito a partir del modelo de Weibull es de 112 MPa y está definido como el incremento necesario de presión para la reducción de un ciclo logarítmico en el parámetro b ,

- Empleando el modelo de Baranyi el parámetro k_{\max} es considerado como el parámetro cinético primario (Perez et al 2007), los valores obtenidos del logaritmo decimal de este parámetro también aumentan al aumentar la presión (Tabla 1), la relación lineal obtenida resultante se describe a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Log}_{10}k_{\max} = 0,0071 P - 1,3407, R^2=0,9935 \quad (10)$$

Por tanto, el valor de z (P) calculado de esta forma es de 140 MPa, definido como el incremento necesario de presión para la reducción de un ciclo logarítmico en la velocidad máxima de muerte relativa (k_{\max}).

- Finalmente, empleando el modelo de Gompertz, y como lo indican Xiong et al (1999), la velocidad máxima de inactivación (parámetro cinético primario) no viene representado por ningún parámetro obtenido directamente de la ecuación sino a través del parámetro μ_{\max} (McMeekin et al., (1993). Originalmente esta fórmula describe la velocidad máxima en curvas de crecimiento a través de la relación de B y C de Gompertz dividido por la constante neperiana. Aplicando esta definición de velocidad máxima para curvas de inactivación, recurrimos al cálculo de μ_{\max} para cada presión. Los valores obtenidos fueron transformados a logaritmo decimal y se relacionaron linealmente con la presión:

$$\text{Log}_{10}\mu_{\max}=0.008P-1.8097, R^2=0.989 \quad (11)$$

El valor de z (P) resultante es de 125MPa siendo los valores obtenidos a partir de los 3 modelos del mismo orden de magnitud.

Valores similares de z (P) han sido determinados por Pilavtepe-Çelik et al (2008) con un modelo no lineal en curvas de inactivación de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada en zumo de zanahoria y agua de peptona, para un rango de presiones de 200 a 400 MPa, siendo z (P) aproximadamente 173 MPa y 70 MPa respectivamente para cada inóculo. El autor, justifica la obtención de estos valores a la existencia de un efecto protector por parte del zumo en la muerte del microorganismo. En el caso de *Listeria monocytogenes* Scott A inoculada en leche y ajustado al modelo de Weibull, Haiqiang y Hoover (2004) calcularon el valor de z (P). Para un rango de presiones de 400 a 600 MPa, Haiqiang obtuvo una constante de 105 MPa El autor, además incide en lo complicado que resulta encontrar un modelo que describa todo tipo de microorganismos y en diferentes sustratos.

Por este motivo se puede considerar coherente el resultado de estos parámetros cinéticos secundarios, a la vez que el ajuste propuesto por los modelos; con vista a caracterizar la resistencia de microorganismos, determinar posibles efectos protectores de los medios y asegurar la inocuidad de alimentos procesados por esta tecnología.

CONCLUSIÓN

Dentro del campo de la inocuidad y seguridad alimentaria, la NACMCF (2006) resalta la necesidad de definir cinéticas de inactivación por presión de microorganismos ya sea en medios de referencia como en los propios alimentos y definir parámetros similares a los valores D y z de temperatura.

En respuesta a esta necesidad se obtuvieron curvas de supervivencia tras tratamientos por APH para *E. coli* CECT 433 inoculada en medio de referencia.

La microbiología predictiva es una herramienta esencial para describir las curvas de inactivación tras el uso de modelos matemáticos, eligiendo el modelo adecuado para hacer predicciones de la fracción de supervivientes en función de la presión y el tiempo. Empleando tres modelos matemáticos se obtuvieron parámetros cinéticos primarios y secundarios para cada uno de ellos.

En concreto, la ecuación modificada de Gompertz resulta ser el modelo matemático más adecuado para describir las curvas de inactivación de *E. coli*, pues presenta las mejores relaciones estadísticas $R^2_c=0,990$, $RMSE=0,138$, $A_f=1,039$ y $B_f=0,999$. El valor de z (P) obtenido indica que es necesario aumentar en 125 MPa la intensidad de tratamiento para poder reducir un ciclo logarítmico el valor de la constante de velocidad.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece la posibilidad ofrecida por el departamento de Conservación y Calidad de los Alimentos, en el grupo de Procesos de Conservación; Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos en especial al Profesor de Investigación Antonio Martínez López, al científico titular M^a Dolores Rodrigo Aliaga y a la doctoranda Daniela Saucedo Reyes por su apoyo en la elaboración de este estudio científico.

REFERENCIAS

- Baranyi J. and Roberts T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23: 277-294.
- Baranyi J., Roberts T. A. and McClure P. (1993). A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiol.* 10: 43-59.

- 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.
- Chen H. and Hoover D. G. (2003). Pressure inactivation kinetics of *Yersenia enterocolitica* ATCC 35669. *Int. J. Food Microbiol.* 87: 161-171.
- 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.
- Erkmen O. and Dogan C. (2004). Kinetic analysis of *Escherichia coli* inactivation by high hydrostatic pressure in broth and foods. *Food Microbiol.* 21: 181-185.
- Koseki S. and Yamamoto K. (2007). A novel approach to predicting microbial inactivation kinetics high pressure processing. *Int. J. Food. Microbiol.* 116: 275-282.
- 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., Carter 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.
- 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.
- [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.
- Pilavtepe-Çelik M.; Buzrul S.; Alpas H.; Bozoglu F. (2008). Development of a new mathematical model for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* by high hydrostatic pressure in carrot juice and peptone water. *Journal of Food Engineering.* 90:388-394.
- Pina Pérez C., Rodrigo Aliaga D., Saucedo Reyes D. and Martínez López A (2007). Pressure inactivation kinetics of *Enterobacter sakasaki* in infant formula milk. *J. Food Prot.* 70(10): 2281-2289.
- 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.
- [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: [Consulta: 10 de Oct. 2008]

- Ross T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 501-508.
- Xiong R., Xie G., Edmondson A. S., Linton R. H. and Sheard M. A. (1999). Comparison of the Baranyi model with the modified Gompertz equation for modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A, *Food Microbiol.* 16: 269-279.
- Yamamoto K., Matsubara M., Kawasaki S., Bari M. L. and Kawamoto S. (2005). Modeling the pressure inactivation dynamics of *Escherichia coli*, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38: 1253-1257.
- Zook C.D., Parish, M.E., Braddock, R. J., Balaban, M. O., 1999. High pressure inactivation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* ascospores in orange and apple juices. *J. Food Sci.* 64 (3), 533-535.