



Modelamiento del Crecimiento de Bacterias Ácido Lácticas en Chorizo Cocido Empacado al Vacío bajo condiciones isotérmicas de refrigeración

Modeling the growth of Lactic Acid Bacteria in cooked chorizo vacuum-packed under isothermal cooling conditions

Cabeza-Herrera, Enrique A¹.; Laguado-Corredor, Gladys E².; Suarez-Quintana, William H¹

¹Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología GIMBIO, Universidad de Pamplona, Pamplona, Colombia.

²Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, CEDRUM Pamplona, Pamplona, Colombia.

Resumen

Las bacterias ácido lácticas (BAL) representan el grupo microbiano alterante específico (SSO) en los productos cárnicos cocidos almacenados al vacío y refrigeración, limitando la vida útil debido al desarrollo de olores desagradables y apariencia verdosa y pegajosa. El objetivo de este estudio fue desarrollar y validar un modelo secundario que describe el crecimiento de BAL en chorizo cocido empacado al vacío y almacenado en refrigeración (2 a 12°C). Los chorizos fueron inoculados con un pool de BAL a concentración de 10² cel/ml, se envasaron al vacío y se almacenaron a temperaturas de refrigeración (2, 3, 5, 7, 10 y 12°C). Los datos de crecimiento fueron ajustados con el modelo de Baranyi y los parámetros cinéticos se determinaron usando el software DMFit. Con los parámetros cinéticos se generaron cinco modelos secundarios, los cuales se validaron a las temperaturas de 3 y 7°C. El desempeño de estos modelos fue evaluado usando el factor de sesgo (B_f) y precisión (A_f), raíz del error cuadrático medio (RMSE) y porcentaje de error medio de predicción (MPE). El análisis de varianza mostró que ninguno de los modelos evaluados presentaron diferencias significativas entre sí a un valor p <0,05. De acuerdo con los factores B_f, A_f, RMSE y MPE, el modelo de la raíz cuadrada doble y el modelo doble inverso presentaron los mejores desempeños y seguridad para estimar la $\mu_{\text{máx}}$ y λ , respectivamente.

PALABRAS CLAVE

Bacteria ácido láctica, Chorizo cocido, empaque al vacío, microbiología predictiva.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) represent the specific spoilage organism group (SSO) in cooked meat products stored under vacuum and refrigeration, limiting shelf life due to the development of unpleasant odors and greenish and sticky appearance. The objective of this study was to develop and validate a secondary model that describes BAL growth in cooked sausage vacuum packed and stored in refrigeration (2 to 12 ° C). The sausages were inoculated with a LAB pool at a concentration of 10^2 cel / ml, vacuum packed and stored at refrigeration temperatures (2, 3, 5, 7, 10 and 12 ° C). The growth data were adjusted with the Baranyi model and the kinetic parameters were determined using the DMFit software. With the kinetic parameters, five secondary models were generated, which were validated at temperatures of 3 and 7 ° C. The performance of these models was evaluated using the bias factor (B_f) and precision (A_f), root mean square error (RMSE) and average error of prediction error (MPE). The analysis of variance showed that none of the models evaluated showed significant differences among themselves at a p-value <0.05. According to the B_f , A_f , RMSE and MPE factors, the double square root model and the inverse double model presented the best performance and safety to estimate the μ_{max} and λ , respectively.

KEYWORDS

Lactic Acid Bacteria, Cooked Chorizo, Vacuum Packing, Predictive Microbiology.

1. INTRODUCCION

Los productos cárnicos son considerados como uno de los grupos de alimentos más susceptibles al deterioro microbiano, y una alternativa para prevenir dicho crecimiento ha sido el control de la temperatura en combinación con otros métodos físicos, biológicos o químicos tales como modificación o control de la atmósfera, reducción del pH y actividad de agua, entre otros (Caicedo, 2016). Dentro de este grupo de productos se encuentran los chorizos cocidos, los cuales pueden consumirse directamente de forma individual, incorporarse como parte de una comida lista para consumo o sometidos a procesos de cocción antes de su consumo (Kuri *et al.*, 1995; Feng *et al.*, 2014).

La vida útil de estos derivados cárnicos puede estar sujeta a diversos factores, tales como la calidad de la materia prima, ingredientes y aditivos, así como el agua empleada en su producción y operaciones de limpieza de equipos (Hernandez et al,2013). La necesidad de conservar la cadena de frío de estos productos cárnicos posterior a su producción durante el almacenamiento, transporte, distribución y venta es quizá el factor más importante que puede afectar seriamente la estabilidad biológica de los

126

mismos, si esta cadena se rompe (Cayré *et al.*, 2003; Cabeza-Herrera *et al.*, 2006; Kreyenschmidt *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2014).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos anaerobios facultativos bastante heterogéneo (Samelis *et al.*, 2000, Calo-Mata *et al.*, 2008, García-Parra *et al.*, 2011, Sánchez-Zapata *et al.*, 2013), y algunas especies son resistentes al calor y ubicuos en el medio ambiente (Cabeza-Herrera *et al.*, 2006; Hongpattarakere *et al.*, 2013) que pueden crecer a temperaturas de refrigeración y debido al metabolismo bioquímico homo y heterofermentativo inducir la acumulación de ácidos orgánicos que pueden estimular el crecimiento de levaduras (Aggelis *et al.*, 1998). Las BAL pueden contaminar los alimentos cárnicos cocidos a partir del aire o superficies de equipos durante el corte o empaquetado (Borch *et al.*, 1996; Hamasaki *et al.*, 2003, Feng *et al.*, 2014), o sobrevivir a los procesos térmicos en especial si estos son suaves (Cabeza-Herrera *et al.*, 2006) y, posteriormente cuando los productos cárnicos se almacenan en condiciones de refrigeración y microaerofílicas, como el envasado al vacío o en atmósfera modificada, las BAL pueden multiplicarse debido a la alta actividad de agua, la baja concentración de oxígeno y un ambiente ácido que crean condiciones más favorables para su crecimiento (Cayré *et al.*, 2005; Slongo *et al.*, 2009) por lo que son consideradas como la biota predominante y por lo tanto se consideran como el organismo de deterioro específico (SSO) en los embutidos cocidos empaquetados al vacío, afectando su vida útil (Cayré *et al.*, 2003, Cabeza-Herrera *et al.*, 2006, Kreyenschmidt *et al.*, 2010, Dissing *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2013, Mathias *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2014), y causando problemas de decoloración, formación de limo, malos olores y sabores desagradables como resultado de su actividad metabólica (Mathias *et al.*, 2013). Típicamente, el recuento inicial de bacterias del ácido láctico en los productos cárnicos envasados al vacío es bajo, pero aumenta durante el almacenamiento refrigerado y puede causar un deterioro evidente cuando el recuento alcanza 7 a 8 log₁₀ UFC/g (Santos *et al.*, 2005; Vermeiren *et al.*, 2005; Cabeza-Herrera *et al.*, 2006; Mathias *et al.*, 2013).

Las técnicas microbiológicas tradicionales para el recuento de microorganismos en alimentos no cumplen con los requerimientos actuales de la industria agroalimentaria para evaluar la seguridad de los procesos y conducir estudios de vida útil, ya que consumen gran cantidad de recursos, tiempo, costos y son laboriosos (Juneja, *et al.*, 2009). Como una alternativa a los métodos clásicos microbiológicos en alimentos, surgió hace unos treinta años la denominada microbiología predictiva, la cual se basa en el uso de herramientas matemáticas, estadísticas e informáticas para desarrollar ecuaciones que permitan estimar como cambian las respuestas microbianas cuando uno o más factores medioambientales se modifican (McMeekin y Ross, 2002). La predicción de la vida útil permite a las empresas optimizar su gestión de almacenamiento y, debido a la

127

minimización de las pérdidas económicas, es uno de los problemas de planificación de la empresa más importantes en estos días (Mathias *et al.*, 2013).

Durante los últimos años, se han desarrollado varios modelos para predecir el crecimiento de organismos específicos de deterioro (SSO) en productos alimenticios frescos como la carne y productos cárnicos frescos (Baranyi *et al.*, 1995; Mataragas *et al.*, 2011). La mayoría de los modelos de vida útil para productos refrigerados describen el crecimiento de SSO según la temperatura, la cual se considera generalmente como el factor de influencia más importante de la vida útil (McMeekin y Ross, 2002; Mathias *et al.*, 2013).

El objetivo de este trabajo fue modelar el crecimiento de BAL en chorizo cocido almacenado al vacío y en condiciones de refrigeración, y a partir de estos datos desarrollar y validar un modelo secundario que permita estimar el crecimiento de BAL a temperaturas de 2 a 12°C.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Cultivo microbiano

En el presente estudio se empleó una mezcla liofilizada de un cultivo de BAL conteniendo *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum* y *L. casei* obtenido del cepario del Departamento de Microbiología de la Universidad de Pamplona, el cual fue reconstituido en caldo MRS (Oxoid Ltda), e incubada a 32°C durante toda la noche antes de su uso.

2.2. Muestra

Las muestras de chorizo parrillero se elaboraron en la planta piloto de cárnicos de la sede agroindustrial del SENA, CEDRUM-Pamplona, empleando una formulación comercial de aditivos y especias propias de este centro educativo. Se prepararon seis lotes de 16,5 kg de masa para chorizo cada uno, los cuales fueron embutidos en tripa natural con un peso aproximado de 125 gr por unidad, los cuales fueron sometidos a cocción a 72°C y previo al empacado al vacío se enfriaron a 4°C y se inocularon con 1 ml del cultivo de BAL conteniendo 10^3 bact/ml.

2.3. Empacado y almacenamiento.

Cada lote de chorizo fue dividido a su vez en 6 lotes de 22 unidades, las cuales fueron empacadas asépticamente y al vacío (10 mbar) en presentación de 250 g (conteniendo dos unidades por empaque) en bolsas estériles de polietileno de baja densidad, y resistente a los gases. Posteriormente fueron almacenados en cuarto oscuro a las temperaturas de 2°C, 3°C, 5°C, 7°C, 10°C y 12°C por 31 días. Cada tres días se tomó un empaque por temperatura y se sometió a análisis microbiológico.

128

2.4. Análisis microbiológico.

Para realizar el análisis microbiológico de las BAL, las muestras se manipularon en cámara de flujo y cada tres días se retiraron asépticamente del empaque y se separó la masa y la piel en dos matrices de estudio (Pinzón *et al.*, 2013), descartando la exterior –piel– como lo indica Cabeza, 2006, se homogenizó la parte interior –masa– de los chorizos y 25 gr fueron puestos asépticamente en bolsa plástica estéril conteniendo 225 ml de agua peptona estéril al 1% (Oxoid, Basingstoke, UK) y homogenizados en un Stomacher Lab-Blender 400 (Seward Ltd., London, UK) durante 1 minuto. Cinco diluciones decimales fueron preparadas y se inoculó 1 ml de cada dilución en cajas de petri estériles, posteriormente se adicionó 25 ml de agar MRS ajustado a pH 5,7 (Oxoid, St. Louis, MO, USA) conteniendo 1 ml/L de Tween 80 (Sigma Aldrich Co.) e incubadas anaeróticamente (AnaeroGen system; Oxoid) por 48 h a 30°C. Los análisis se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como Log₁₀ UFC/g.

2.5. Desarrollo de los modelos

Los datos de crecimiento para cada temperatura fueron ajustados mediante análisis de regresión no lineal al modelo primario de Baranyi (Baranyi y Roberts, 1994) usando el software DMFit 2.1 para obtener los parámetros cinéticos: fase de latencia (λ), velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) y máxima densidad poblacional ($N_{\text{máx}}$). El modelo de Baranyi se define mediante la ecuación 1:

$$\ln(N(t)) = \ln(N_0) + \mu_{\text{máx}}A(t) - \ln\left[1 + \frac{e^{\mu_{\text{máx}}A(t)} - 1}{e^{(N_{\text{máx}} - N_0)}}\right] \quad (\text{ecc. 1})$$

Donde $\ln(N(t))$ es el log de la concentración celular al tiempo t [d(día)] (UFC/g); $\ln(N_0)$ es el log de la concentración celular inicial (UFC/g); $\mu_{\text{máx}}$ es la velocidad de crecimiento exponencial (log UFC/g día); $\ln(N_{\text{máx}})$ es el log de la concentración celular final (UFC/g); y A es un parámetro que representa el aumento logarítmico de la población relacionado al estado fisiológico celular, y se determina mediante la ecuación 2:

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\text{máx}}} \ln(e^{\mu_{\text{máx}}t} + e^{-\mu_{\text{máx}}\lambda} - e^{-\mu_{\text{máx}}(t+\lambda)}) \quad (\text{ecc. 2})$$

Donde t representa el tiempo [d(día)]; $\mu_{\text{máx}}$ es la velocidad de crecimiento exponencial (log UFC/g día) y λ es el tiempo de latencia (d).

Para el desarrollo de los modelos secundarios se usó la $\mu_{\text{máx}}$ obtenida a las temperaturas de 2, 5, 10 y 12°C, mientras que para la validación de los modelos se usó la $\mu_{\text{máx}}$ obtenida a las temperaturas de 3 y 7°C. Con los datos de $\mu_{\text{máx}}$ vs temperatura

129

empleando análisis de regresión con el software Statgraphics Centurión XV (Statpoint, Inc. USA) fueron generados 24 modelos, de los cuales se seleccionaron los cinco mejores de acuerdo con los valores obtenidos para los índices de regresión, correlación, regresión ajustada y error cuadrático medio, tal como lo propone Gutiérrez y De la Vara (2012). El mismo procedimiento fue usado para generar los modelos de duración de la fase de latencia (resultados no mostrados en este trabajo).

Los siguientes índices fueron usados en orden para comparar la bondad del ajuste de los modelos: coeficiente de correlación (R), Coeficiente de determinación (R^2), Coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}), Error estándar (DS), y la Media del Error Absoluto (MEA).

2.6. Análisis estadístico para la validación de los modelos secundarios.

Para la validación del rendimiento de los modelos se usaron en su orden los siguientes índices: factor de sesgo (B_f) y precisión (A_f); raíz del error cuadrático medio (RMSE); porcentaje de error medio de predicción (MPE) y coeficiente de regresión (R^2).

El factor B_f y A_f establecidos por Ross (1996), quedan definidos en las ecuaciones 3 y 4, respectivamente. El factor B_f consiste en una estimación de la diferencia promedio entre lo observado y lo estimado, e idealmente debería estar cerca de 1. Si el valor es mayor que 1, indica que el valor estimado es mayor que el observado, pero si es más bajo, indica que el valor estimado es menor que el observado. El B_f responde a la pregunta de si en promedio los valores predichos por el modelo son mayores o menores a los observados. En este sentido, el factor de sesgo es una medida de la seguridad de las predicciones del modelo, y queda expresado mediante la siguiente ecuación:

$$B_f = 10 \left[\frac{\sum \log\left(\frac{P}{O}\right)}{n} \right] \quad (ecc. 3)$$

Donde P representa el valor estimado o predicho, O representa el valor observado, n es el número de observaciones usadas en la validación de los modelos.

Por otra parte, el factor A_f es la suma de las diferencias absolutas entre los valores de predicción y observación y mide el error general del modelo, es decir, mide que tan cerca se encuentra en promedio los valores predichos y los observados, por lo tanto, este índice es una medida de la desviación media y puede ser utilizado como una medida simple del nivel de confianza del modelo. Cuanto más grande sea este valor, menos preciso es la estimación en promedio del modelo, este índice se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$A_f = 10 \left[\frac{\sum \left| \log\left(\frac{P}{O}\right) \right|}{n} \right] \quad (ecc. 4)$$

130

Donde P representa el valor estimado o predicho, O representa el valor observado, n es el número de observaciones usadas en la validación de los modelos.

El valor de MSE (ecc. 5) y RMSE (ecc. 6) se basan en las diferencias entre los valores predichos y observados, un menor valor de MSE y RMSE indican que los modelos no son ajustes generados al azar (Feng *et al.*, 2014), y a su vez indican una mayor precisión del modelo que se usa para describir (o predecir) los puntos experimentales (Cayré *et al.*, 2003; Sant'Ana *et al.*, 2012; Mathias *et al.*, 2013).

$$MSE = \sum \frac{(P - O)^2}{n - p} \text{ (ecc. 5)}$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum(P - O)^2}{n - p}} \text{ (ecc. 6)}$$

Donde P representa el valor estimado o predicho, O representa el valor observado, n representa el número de observaciones y p es un valor que representa el número de parámetros del modelo.

Para la validación interna o matemática de los modelos también fue usado el error medio de predicción de cada modelo para cada una de las temperaturas evaluadas. Este error de predicción fue calculado empleando la ecuación 7 propuesta por Mataragas *et al.* (2011), la cual se muestra a continuación:

$$MPE = \left[\frac{(O - P)}{O} \times 100 \right] \text{ (ecc. 7)}$$

Donde MPE representa el error medio de predicción (en porcentaje); O indica la velocidad máxima de crecimiento observada (Log_{10} ufc/g*ml); P indica la velocidad máxima de crecimiento estimada (Log_{10} ufc/g*ml).

2.7. Diseño Experimental

Se trabajó con un diseño completamente aleatorio generando 36 curvas de crecimiento correspondientes a seis niveles de temperatura, dos duplicados y tres repeticiones por tratamiento. Todos los datos de crecimiento de BAL, los ajustes y los modelos generados y validados fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias de Tukey para determinar diferencias significativas entre tratamientos con un nivel de significancia del 5%. Los datos de crecimiento bacteriano fueron transformados a Log_{10} para linealizar el comportamiento y normalizar su varianza. Todo el análisis estadístico se realizó usando el software Statgraphics Centurión XV.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Crecimiento de BAL

Los parámetros microbiológicos de crecimiento de BAL en el chorizo cocido se presentan en la Tabla 1. Estos resultados se obtuvieron ajustando las curvas de crecimiento microbiano obtenidas a las temperaturas de almacenamiento de 2, 3, 5, 7, 10 y 12 °C al modelo de Baranyi, usando el software DMFit 2.1. En todos los casos se obtuvo un ajuste de las curvas de crecimiento frente al modelo completo de Baranyi superior al 92% ($R^2=0,92$).

Frente a la velocidad de crecimiento en función de la temperatura se pudo observar una relación lineal directa, dónde la velocidad aumenta de forma proporcional al aumento de la temperatura, pasando de 0,0170 $\text{Log}_{10}\text{ufc/g}\cdot\text{h}$ a 2°C hasta 0,0505 $\text{Log}_{10}\text{ufc/g}\cdot\text{h}$ a una temperatura de 12°C. En cuanto a la duración de la fase de latencia, esta disminuye en general siguiendo una función logarítmica inversa, es decir conforme aumenta la temperatura la duración de la fase de latencia disminuye notoriamente entre 2 y 3 °C (pasando de 400 horas hasta 220 horas), pero a temperaturas de 5 hasta 12°C la duración se sitúa en torno a las 160 – 150 horas aproximadamente. En todos los casos, la máxima densidad de población alcanzada fue del orden de 10^7 y 10^8 ufc/g, resultados que son bastante similares a los obtenidos por diversos autores como Cayré *et al.*, 2003; Mathias *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2014.

Tabla 1. Parámetros cinéticos del crecimiento de BAL calculados mediante ajuste primario del modelo de Baranyi.

Temperatura (°C)	R ² del ajuste	$\mu_{\text{máx}}$ ($\text{Log}_{10}\text{ufc/g}\cdot\text{h}$)	λ (horas)	Y ₀ ($\text{Log}_{10}\text{ufc/g}$)	Y _{máx} ($\text{Log}_{10}\text{ufc/g}$)
2	0,963	0,0170	414,84	2,13	7,00
3	0,949	0,0216	221,86	2,30	7,32
5	0,927	0,0275	162,58	2,49	7,07
7	0,983	0,0313	157,26	2,41	7,41
10	0,969	0,0403	153,50	2,25	7,23
12	0,960	0,0505	150,97	2,56	7,38

$\mu_{\text{máx}}$ Velocidad máxima de crecimiento; λ Duración de la fase de latencia; Y₀ Mínima densidad de población; Y_{máx} Máxima densidad de población.

Las curvas de crecimiento experimental de LAB en diferentes condiciones de almacenamiento, se muestran en la figura 1, mientras que en la figura 2 se muestran las curvas de crecimiento ajustadas con el modelo de Baranyi.

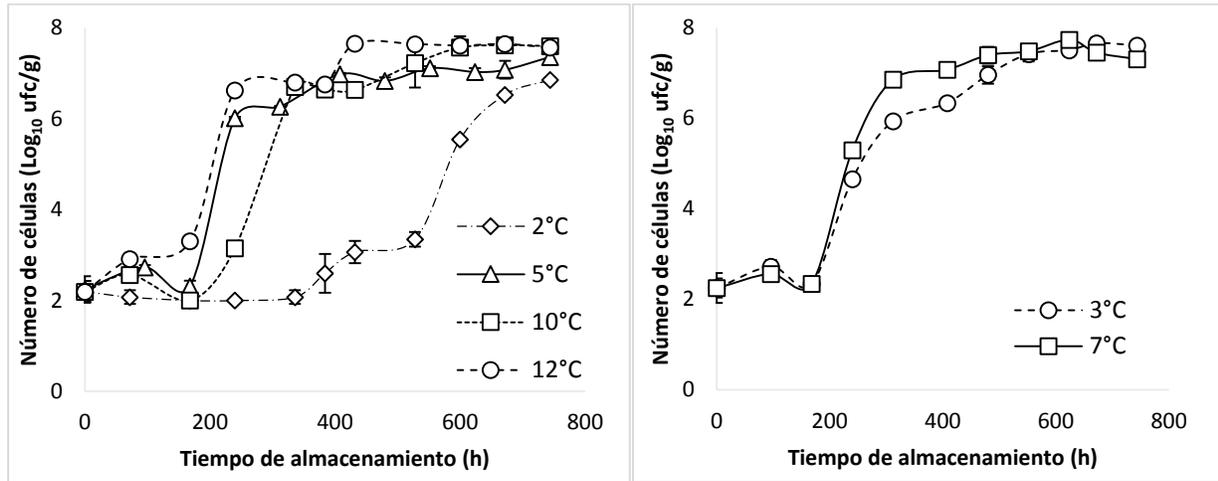


Figura 1. Curvas de crecimiento de BAL durante el almacenamiento del chorizo a temperaturas de refrigeración. a) Temperaturas usadas para generar los modelos (2°C, 5°C, 10°C, y 12°C). b) Temperaturas usadas para validar los modelos (3°C y 5°C).

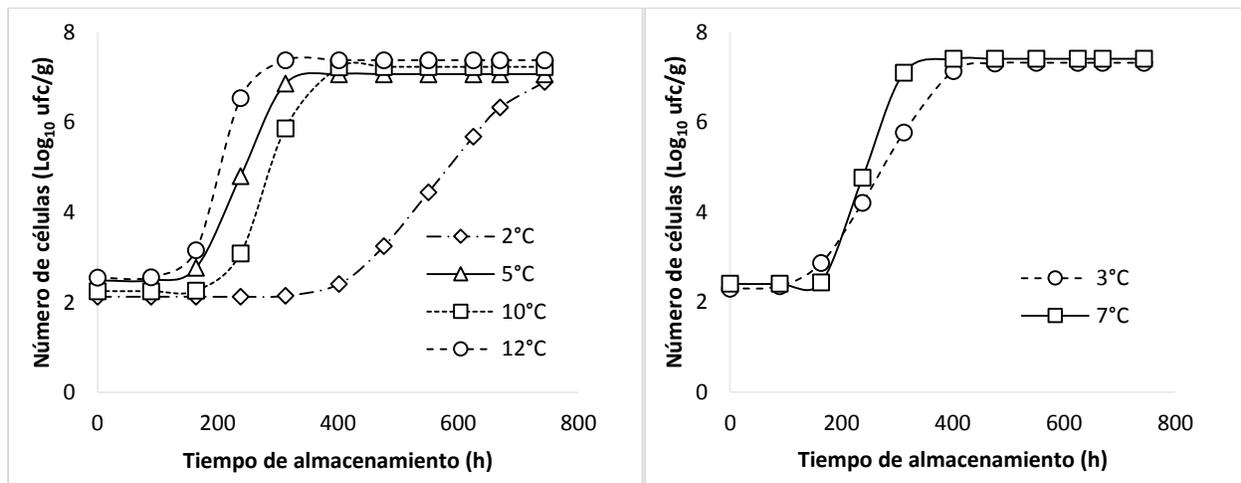


Figura 2. Curvas de crecimiento de BAL ajustadas con el modelo de Robert y Baranyi para el almacenamiento del chorizo a las temperaturas de refrigeración. a) Temperaturas usadas para generar los modelos (2°C, 5°C, 10°C, y 12°C). b) Temperaturas usadas para validar los modelos (3°C y 5°C).

3.2. Desarrollo de los modelos

Mediante regresión lineal simple se contrastó la velocidad máxima de crecimiento como una función de la temperatura de 2, 5, 10 y 12°C, obteniéndose 24 modelos de regresión con un R^2 mayor al 70%, de los cuales se seleccionaron los cinco mejores de acuerdo con un coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}) $> 0,980$ y que son mostrados en la tabla 2. Se usó este índice ya que es un indicativo de la calidad del

133

ajuste del modelo a los datos, y permite medir la proporción o porcentaje de variabilidad en los datos experimentales que es explicada por el modelo, así como hacer estimaciones de la variación de la variable de respuesta en diferentes valores de los factores estudiados, con una precisión aceptable. Sin embargo, de acuerdo con Gutiérrez y De la Vara (2012), para fines de predicción, se recomienda usar un R^2_{aj} de al menos 70%, en lugar del R^2 , ya que este último aumenta de manera artificial con cada término que se agrega al modelo, aunque sea un término que no contribuye en mucho a la explicación de la respuesta, sin embargo, el R^2_{aj} baja de valor cuando el término que se agrega no aporta mucho a la explicación de la respuesta. Sin embargo, de acuerdo con Gan *et al.*, 2007 y Mataragas *et al.*, 2011, un valor de R^2 de al menos un 80% es considerado aceptable para los modelos predictivos en microbiología. Los modelos seleccionados fueron comparados frente a dos modelos de referencia ampliamente usados en microbiología predictiva, cuando se quiere evaluar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento o muerte: Modelo de la Raíz Cuadrada de Ratkowsky *et al.* (1983) y el Modelo de Arrhenius descrito por Giannuzzi *et al.* (1998), los cuales corresponden a los modelos 6 y 7 mostrados en la tabla 2.

Tabla 2. Modelos generados para estimar el crecimiento de BAL en chorizo cocido empacado al vacío.

No.	Modelo matemático	Nombre del modelo
1	$\mu_{m\acute{a}x} = e^{[-4,77793+(0,51052*\sqrt{T})]}$	Modelo Y logarítmico – X Cuadrática
2	$\mu_{m\acute{a}x} = [0,06732 + (0,04402 * \sqrt{T})]^2$	Modelo de la raíz cuadrada doble
3	$\mu_{m\acute{a}x} = [0,11551 + (0,00895 * T)]^2$	Modelo raíz cuadrada de Y
4	$\mu_{m\acute{a}x} = e^{[-4,49997+(0,58315*LnT)]}$	Modelo Multiplicativo (Y logarítmico – X logarítmico)
5	$\mu_{m\acute{a}x} = 0,01077 + (0,00318 * T)$	Modelo lineal
6	$\sqrt{\mu_{m\acute{a}x}} = -2,32888 + (0,00895 * T_A)$	Modelo de la raíz cuadrada de Ratkowsky
7	$Ln\mu_{m\acute{a}x} = 25,3763 - \frac{67185,434}{RT_A}$	Modelo de Arrhenius

En la tabla 3 se muestra los coeficientes de calidad de ajuste de los modelos generados y los modelos de referencia, observando que en todos los casos el R^2_{aj} fue mayor al 97%,

Tabla 3. Coeficientes de calidad de ajuste de los modelos generados, valor p para una significancia < 0,05.

Modelo	R	R ²	R ² _{aj}	DS	MEA	Valor p
1	0,996	0,993	0,989	0,0501	0,0332	0,0037
2	0,994	0,989	0,983	0,0054	0,0029	0,0057
3	0,994	0,988	0,982	0,0056	0,0037	0,0061
4	0,994	0,987	0,981	0,0658	0,0432	0,0064
5	0,994	0,987	0,981	0,0020	0,0012	0,0065
6	-0,994	0,988	0,982	0,0056	0,0037	0,0061
7	-0,989	0,978	0,967	0,0869	0,0502	0,0111

R² Coeficiente de determinación; R²_{aj} Coeficiente de determinación ajustado; DS Error estándar; MEA Media del Error Absoluto.

El ANOVA simple de todos los modelos de regresión seleccionados, así como los de referencia, se obtuvo un valor p < 0,05, lo que indica que en todos los casos existe una relación estadísticamente significativa entre la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) y la temperatura, con un nivel de confianza del 95,0%, mientras que el estadístico de Durbin-Watson para todos los modelos fue superior a un p > 0,05, indicando que no existe una auto correlación serial en los residuos, es decir, que se cumple con el supuesto de independencia de los residuos con una confianza del 95% (datos no mostrados). Así mismo, todos los modelos seleccionados presentaron una fuerte correlación entre las variables analizadas (R > ± 0,98), indicando que son buenos estimadores de la variación entre la respuesta ($\mu_{m\acute{a}x}$) y el factor analizado (Temperatura).

3.3. Validación de los modelos

Tabla 4. Índices matemáticos usados para validar los modelos que describen el efecto de la temperatura de refrigeración en el crecimiento de BAL en chorizo cocido empacado al vacío.

Modelo	B_f	A_f	MSE	RMSE	MPE	R ²
1 ^a	0,990	1,049	0,041	0,002	3,77	0,999
2 ^a	1,015	1,064	0,052	0,003	4,02	0,996
3 ^b	0,977	1,040	0,037	0,001	4,11	0,999
4 ^d	1,039	1,064	0,058	0,003	5,05	0,994
5 ^b	0,991	1,064	0,048	0,002	4,13	0,997

6 ^{ab}	0,977	1,040	0,037	0,001	4,08	0,999
7 ^c	0,956	1,046	0,040	0,002	4,55	0,999

B_f Factor de sesgo; A_f Factor de exactitud; RMSE Raíz del error cuadrado medio; MPE Porcentaje de Error medio de predicción

De acuerdo con los resultados presentados en la tabla anterior, puede observarse que todos los modelos evaluados para estimar el crecimiento de BAL presentan un factor de exactitud (A_f) mayor a uno, pero en el caso de los modelos 3 y 6 presentaron la menor desviación entre los valores observados y estimados, mientras que el 4 y 5 presentaron la mayor desviación, pero no indica si su respuesta estimada es mayor o menor a la observada. En todos los casos, no se observaron diferencias significativas a nivel $p < 0,05$ en los valores de exactitud de los siete modelos evaluados.

para que la población de BAL alcanzara el límite definido para la validez del producto fue mayor en las muestras almacenadas a 2 y 3°C, que la observada para las temperaturas mayores a 5°C. De igual forma, el modelo de Baranyi proporcionó un buen ajuste para la variación de la población de BAL con el tiempo de almacenamiento, mostrando altos coeficientes determinantes para los ajustes de regresión. La microbiología predictiva demostró ser una herramienta valiosa para proporcionar una buena estimación de la validez del producto basada en el crecimiento de bacterias ácido lácticas, y se demostró que la temperatura de almacenamiento tuvo una gran influencia en el crecimiento de BAL a un valor $p < 0,05$, observándose un efecto directo entre estas variables, es decir, con el aumento de la temperatura también aumentó la velocidad de crecimiento. Sin embargo, este incremento no responde de forma lineal en el rango evaluado de 2 hasta 12°C, por lo que el desarrollo de los modelos implica una previa transformación de las variables con el objeto de linealizarlas y obtener un modelo simple. No obstante, al transformar las variables y linealizar la respuesta (velocidad de crecimiento), el modelo de Arrhenius fue el que presentó los peores índices de desempeño, lo que indica que este modelo puede ser el ideal para describir la relación del comportamiento de las variables fisicoquímicas de un producto en función del cambio de temperatura, pero no es el idóneo para modelizar el comportamiento microbiano en función de la temperatura. Los resultados mostraron la importancia de mantener bajas temperaturas para lograr una mayor viabilidad comercial, y también que el uso del empacado al vacío incrementó la validez comercial al disminuir el crecimiento de BAL. Finalmente, la validación externa indicó que el mejor modelo para estimar el crecimiento de BAL en chorizo corresponde a un Modelo de la Raíz Cuadrada Doble, el cual no fue el modelo que mostró un mejor desempeño durante la validación interna. Cabe recordar nuevamente, que el mejor modelo no es el que mejor se adapte a los datos, sino el que estime mejor las respuestas.



Referencias Bibliograficas

- Aggelis G, Samelis J., Metaxopoulos J. (1998). A novel modeling approach for predicting microbial growth in a raw cured meat products stored at 3°C and 12°C in air. *Int J Food Microbiol*, 43: 39 – 52.
- Baranyi J, Pin C, Ross T. (1999). Validating and comparing predictive models. *Int J Food Microbiol*, 48: 159 – 166.
- Baranyi J, Roberts TA. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol*, 23: 277 – 294.
- Baranyi J., Robinson TP, Kaloti A., Mackey BM. (1995). Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *Int J Food Microbiol*, 27: 61 – 75.
- Borch E, Kant-Muermans ML, Blixt Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat product. *Int J Food Microbiol*, 33(1): 103 – 120.
- Cabeza EA. (2006). Aportaciones a la caracterización de la morcilla de León y evolución de determinados parámetros físicos, químicos y microbiológicos durante su conservación a refrigeración. Tesis Doctoral Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad de León. León, España. Pp. 102.
- Cabeza-Herrera EA, Zumalacárregui-Rodríguez JM, Mateo-Oyagüe J. (2006). Alteración microbiana de los productos cárnicos cocidos durante su almacenamiento a refrigeración. *Alimentación, equipos y tecnología*, 208: 57 – 61.
- Caicedo LM. (2016). Desarrollo de modelos matemáticos predictivos, para la estimación de vida útil en derivados cárnicos procesados de la Cooperativa Colanta. Trabajo de grado en Microbiología. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona. Págs. 1 – 86.
- Calo-Mata P, Arlindo S, Boehme K, Miguel TD, Pascoal A, Barros-Velazquez J. (2008). Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food Bioprocess Tech*, 1: 43 – 63.
- Cayré ME, Garro OM, Vignolo GM. (2005). Effect of storage temperature and gas permeability of packaging film on the growth of lactic acid bacteria and *Brochothrix thermosphacta* in cooked meat emulsions. *Food Microbiol*, 22: 505 – 512.
- Cayré ME, Vignolo G, Garro O. (2003). Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsions stored at three temperatures. *Food Microbiol*, 20: 561 – 566.
- Costa R, Kristbergsson K. (2009). Predictive modeling and risk assessment. Costa R Ed. Springer.
- Dissing BS., Papadopoulou OS., Tassou C., Ersbøll BK., Carstensen JM., Panagou E., Nychas GJ. (2013). Using multispectral imaging for spoilage detection of pork meat. *Food Bioprocess Tech*, 6: 2268 – 2279.
- Feng C-H, Drummond L, Sun D-W. (2014). Modelling the growth parameters of lactic acid bacteria and total viable count in vacuum-packaged Irish cooked sausages cooled by different methods. *Int J Food Sci Technol*, 49: 2659 – 2667.



- Gan HE, Karim R, Muhammad SKS, Bakar JA, Hashim DM, Rahman RA. (2007). Optimization of the basic formulation of a traditional baked cassava cake using response surface methodology. *LWT – Food Sci Technol*, 40: 611 – 618.
- García-Parra MD., García-Almendarez BE., Guevara-Olvera L., Ramón G., Guevara-González RG., Rodríguez A., Martínez B., Domínguez-Domínguez J., Regalad C. (2011). Effect of sub-inhibitory amounts of nisin and mineral salts on nisin production by *Lactococcus lactis* UQ2 in skim milk. *Food Bioprocess Tech*, 4: 646 – 654.
- Giannuzzi L, Pinotti A, Zaritzky N. (1998). Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. *Int J Food Microbiol*, 39: 101 – 110.
- Gutiérrez H, De la Vara R. 2012. Capítulo 11 Análisis de regresión. En: Análisis y Diseño de Experimentos, 3ª ed. McGraw Hill.
- Hamasaki Y, Ayaki M, Fuchu H, Sugiyama M, Morita H. (2003). Behavior of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from spoiling cooked meat products. *Appl Environ Microbiol*, 69: 3668 – 3671.
- Hernández Garcia J. A., Ariza Garcia J., Cano Calle Hde J., Contreras Pineda J .2013.Estandarización de una técnica para la certificación de jardines clonales de plantas de cacao(*Theobroma cacao*) usando marcadores moleculares rapid. *Bistua:Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*.10(2):75-84
- Hongpattarakere T, Rattanaubon P, Buntin N. (2013). Improvement of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* survival using wáter extracts and crude fibers from food crops. *Food Bioprocess Tech*, 6: 1885 – 1896.
- Juneja VK, Valenzuela MM, Huang L, Subbiah J, Thippareddi H. (2009). Mathematical modeling of growth of *Salmonella* in raw ground beef under isothermal conditions from 10 to 45°C. *Int. J. Food Microbiol*, 131(2-3): 106 – 111.
- Kreyenschmidt J, Hübner A, Beierle E, Chonsch L, Scherer A, Petersen B. (2010). Determination of the shelf life of sliced cooked ham based on the growth of lactic acid bacteria in different steps of the chain. *J Appl Microbiol*, 108: 510 – 520.
- Kuri V, Madden RH, Collins MA. (1995). Hygienic quality of raw pork and chorizo (raw pork sausage) on retail sale in Mexico City. *J Food Protect*, 59: 141 – 145.
- Li MY, Sun XM, Zhao GM, Huang XQ, Zhang JW, Tian W, Zhang QH. (2013). Comparison of mathematical models of lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged raw beef stored at different temperatures. *J Food Sci*, 78: M600 – M604.
- Martinez P., Cesar, Verhelst S., Adriana L. (2015). Calidad microbiologica de carne bovina en plantas de beneficio. *Revista @limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*. ISSN 1692-7125. Volumen 13 N° 1. Pp: 72 – 80.
- Mataragas M, Dimitriou V, Skandamis PN, Drosinos EH. (2011). Quantifying the spoilage and shelf-life of yogurt with fruits. *Food Microbiol*, 28: 611 – 616.
- Mathias SP, Rosenthal A, Gaspar A, Aragão GMF, Slongo-Marcusi A. (2013). Prediction of acid lactic-bacteria growth in turkey ham processed by high hydrostatic pressure. *Braz J Microbiol*, 44(1): 23 – 28.
- McMeekin TA, Ross T. (2002). Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *Int J Food Microbiol*, 78, 133 – 153.



- Pinzón MI, Londoño A, Blach D, Gutiérrez JA, Rojas AM. (2013). Determinación de residuos de plaguicidas organoclorados POR gc- μ ECD en frutos de PIÑA (*Ananas comosus* L.) variedad Golden MD2 en el departamento del Quindío. *Bistua*, 9(2): 4 – 8.
- Ratkowsky DA, Lowry RK, McMeekin TA, Stokes AN, Chandler RE. (1993). Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J Bacteriol*, 154(3): 1222-1226.
- Ríos, P. Cindy, Maldonado M. Lida. Y., Caballero P., Luz A., (2016). Bebida fermentada a base de arroz con adición de probióticos. Norte de Santander. Revista @limentech,Ciencia y Tecnología Alimentaria. ISSN: 1692-7125. Volumen 14 N°1. Pp.58 -73.
- Ross T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J Appl Bacteriol*, 81: 501 – 508.
- Ross T, Dalgaard P, Tienungoon S. (2000). Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *J Food Microbiol*, 62: 231 – 245.
- Samelis J, Kakouri A, Rementzis J. (2000). Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *Food Microbiol*, 17: 329 – 340.
- Sánchez-Zapata E, Díaz-Vela J, Pérez-Álvarez JA, Fernández-López J. (2013). Evaluation of the effect of tiger nut fiber as a carrier of unsaturated fatty acids rich oil on the quality of dry-cured sausages. *Food Bioprocess Tech*, 6: 1181 – 1190.
- Sant'Ana AS, Franco BDGM, Schaffner D. (2012). Modeling the growth rate and lag time of different strains of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat lettuce. *Food Microbiol*, 30: 267 – 273.
- Santos EM, Jaime I, Rovira J, Lyhs U, Korkeala H, BjeOrkroth J. (2005). Characterization and identification of lactic acid bacteria in "Morcilla de Burgos". *Int J Food Microbiol.*, 97: 285 – 296.
- Slongo AP, Rosenthal A, Camargo LMQ, Deliza R, Mathias SP, Aragão GMF. (2009). Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. *LWT-Food Sci Technol.*, 42: 303 – 306.
- Vermeiren L, Devlieghere F, De Graef V, Debevere J. (2005). *In vitro* and *in situ* growth characteristics and behavior of spoilage organisms associated with anaerobically stored cooked meat products. *J Appl Microbiol*, 98(1): 33 – 42.

*Para citar este artículo: Cabeza-Herrera E A; Laguado-Corredor G E; Suarez-Quintana William H. Modeling of growth of Lactic Acid Bacteria in cooked sausage vacuum-packaged under isothermal conditions. Revista Bistua. 2019 17(1):124-138

+ Autor para el envío de correspondencia y la solicitud de las separatas: Cabeza-Herrera E A. Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología GIMBIO, Universidad de Pamplona, Pamplona, Colombia email: enalcahe@unipamplona.edu.co

Recibido: Marzo 19 de 2018

Aceptado: Agosto 15 de 2018