

MODELOS CINÉTICOS APLICADOS AL CRECIMIENTO DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* EN LECHE

Growth Kinetics Models Applied to *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in Milk

Emiro Valbuena¹, José Barreiro³, Egar Sánchez², Gustavo Castro¹, Wilfido Bríñez¹ y Armando Tovar¹

¹Laboratorio de Ciencia y Tecnología de la Leche. ²Unidad de Bioestadística.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Apartado 15252. Maracaibo 4005-A, Venezuela.

³Departamento de Tecnología de Procesos Biológicos y Bioquímicos, Universidad Simón Bolívar.

Sartenejas, Venezuela. E-mail: evalbuena@luz.edu.ve

RESUMEN

El *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* es una bacteria ácido-láctica muy utilizada como cultivo iniciador principalmente en quesos madurados, capaz de producir algunas bacteriocinas, entre estas la nisina, por lo cual su uso como preservador es importante. En el presente trabajo se utilizaron modelos cinéticos con el objeto de describir el crecimiento de este microorganismo en leche en polvo reconstituida, con los cuales es posible predecir su dinámica dentro del rango de temperatura estudiado, entre 9 y 39°C. Se utilizó la ecuación de Gompertz con cuatro parámetros de regresión para modelar cada una de las curvas de crecimiento obtenidas experimentalmente. Como resultado de este proceso, se obtuvieron los parámetros necesarios para calcular la fase de adaptación (λ), tasa de crecimiento exponencial (μ_m) y el tiempo de generación (Tg). Estos parámetros microbiológicos fueron relacionados con la temperatura en un modelo secundario, en el cual, la fase de adaptación y el tiempo de generación fueron bien ajustados utilizando una ecuación hiperbólica, obteniendo un $R^2 = 0,922$ y $0,991$ respectivamente, mientras que la tasa de crecimiento se modeló utilizando la ecuación de la raíz cuadrada de Ratkowsky ($R^2 = 0,991$). Se recomienda utilizar la metodología descrita para estudiar el crecimiento de este microorganismo en quesos frescos, incluyendo en el modelo la cinética de producción de nisina.

Palabras clave: *Lactococcus lactis*, microbiología predictiva, modelo de Gompertz, cinética de crecimiento.

ABSTRACT

Lactococcus lactis subsp. *lactis* is a lactic acid bacteria frequently employed as a starter culture for ripened cheese. This microorganism is capable of producing several bacteriocins such as nisin, that is precisely why its use as a preservative is important. In the present work, growth kinetics models were used to describe the growth of this microorganism in reconstituted powder milk, to predict its growth dynamic within the temperature range studied (9-39°C). Gompertz equation with four regression parameters was used to model for each one of the growth curves experimentally obtained. As a result, the necessary parameters to calculate the adaptation phase, maximum rate of exponential growth and generation time were obtained. Microbiological parameters were compared with temperature in a secondary model. In this model the lag time (λ), and generation time (Tg) were well adjusted using an hyperbolic equation, obtaining a $R^2 = 0.922$ and 0.991 , respectively. The Ratkowsky square root equation ($R^2 = 0.991$) was used to model the growth rate (μ_m). It is recommended to use previously described methodology to study the growth of this microorganism in fresh chesses, including in the model the kinetics of nisin production.

Key words: *Lactococcus lactis*, predictive microbiology, Gompertz model, growth kinetics.

INTRODUCCIÓN

La leche y sus derivados representan un grupo de alimentos caracterizados por su gran valor nutricional; sin embargo, la mayor parte de ellos son altamente perecederos, situación que no puede controlarse mediante el uso de sustancias preservativas, debido a que las normativas vigentes tanto en

Venezuela como en otros países, son estrictas en cuanto a la ausencia de preservativos químicos en la leche y en sus productos derivados, salvo algunas excepciones. Por otra parte, es evidente la exigencia de un consumidor mejor formado, hacia el consumo de alimentos sin la adición de elementos extraños al mismo, por lo cual se hace cada vez más importante desarrollar formas de conservación basadas en la biopreservación [8, 11].

Las bacterias ácido-lácticas han sido utilizadas como biopreservadores en productos alimenticios de diversa índole, incluyendo productos lácteos como quesos frescos y madurados, con el objeto de evitar la proliferación de patógenos como *Listeria monocytogenes*, diversas especies de *Clostridium* y *Staphylococcus aureus*, siendo este último reconocido como responsable de frecuentes brotes de intoxicaciones alimentarias en Venezuela [3, 14].

El *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* es un microorganismo mesófilo, capaz de fermentar la lactosa produciendo ácido láctico en gran cantidad, de la misma forma es capaz de producir algunas sustancias antibacterianas conocidas en forma genérica como bacteriocinas, entre las cuales destacan la nisina y la diplococcina. Ambos factores, acidez y bacteriocinas, son capaces de inhibir el crecimiento de un amplio rango de microorganismos [4, 6, 8].

Diversos modelos matemáticos han sido desarrollados con el objeto de predecir el comportamiento de las poblaciones bacterianas cuando crecen en condiciones controladas de laboratorio y muchos de ellos han logrado ser validados en condiciones de producción, transporte y almacenamiento de alimentos, esto es posible incluso tomando en cuenta variaciones en factores de crecimiento extrínsecos como la temperatura y en otros intrínsecos como la concentración de sal, actividad de agua, entre otros [5, 18, 19].

La microbiología predictiva utiliza los modelos matemáticos para describir el comportamiento microbiano, incluyendo las expresiones que describen cómo las poblaciones bacterianas cambian con respecto al tiempo dentro de determinadas condiciones. Las respuestas obtenidas como la tasa de crecimiento (μ_m), fase de adaptación (λ), densidad poblacional máxima, tiempo para la formación de algún metabolito específico, por ejemplo, pueden luego ser modelados con respecto a la influencia que sobre los mismos ejercen otras variables intrínsecas o extrínsecas presentes [15, 17, 21].

Esta rama de la microbiología de alimentos permite estimar el crecimiento, la supervivencia y/o la muerte de los microorganismos en relación a los factores críticos que los afectan, como lo son la temperatura, pH, actividad de agua y otros [9, 15].

El presente trabajo tuvo como objetivo aplicar los modelos matemáticos que mejor se ajusten a los valores poblacionales obtenidos experimentalmente para describir las curvas de crecimiento del microorganismo *Lactococcus lactis* subsp.

lactis, a once temperaturas en estudio, dentro del rango de 9 a 39°C y a partir de las ecuaciones desarrolladas calcular los principales parámetros que describen el crecimiento microbiano (tiempo de adaptación, tasa máxima de crecimiento exponencial y tiempo de generación) a nivel del modelo primario y lograr finalmente, describir el comportamiento de estos parámetros, en función a la temperatura dentro del rango estudiado mediante el empleo de modelos secundarios [5, 20].

MATERIALES Y MÉTODOS

Medio y condiciones de crecimiento

Se utilizó como medio para el crecimiento leche en polvo descremada, libre de inhibidores, reconstituida al 10% y luego esterilizada en autoclave a 110°C/10 min.

Se colocaron 25 mL de leche en tubos de ensayo previamente esterilizados, los mismos fueron inoculados con el microorganismo hasta alcanzar un nivel inicial cercano a $1,0 \times 10^3$ UFC/mL. El cultivo de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (ATCC 29146) fue utilizado en fase logarítmica de crecimiento, la cual se alcanzó por incubación previa en leche a 30°C durante 12 horas y luego diluyendo en forma seriada en leche estéril hasta alcanzar el título requerido.

Las temperaturas en las cuales se estudió el crecimiento fueron; 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 y 39°C con una variación de $\pm 0,1^\circ\text{C}$, lo cual se consiguió utilizando un baño de circulación termoregulado con refrigeración, marca Forma Scientific, modelo 2161.

Para cada temperatura se incubaron 15 tubos en las condiciones descritas y dependiendo de la relación tiempo-temperatura en estudio, fueron retirados del baño y se tomaron alícuotas de cada uno de ellos para medir por duplicado la población del *L. lactis*, en forma tal de obtener una representación de toda la curva de crecimiento, fase de adaptación, de crecimiento exponencial y comienzo de la fase estacionaria.

Análisis microbiológico

Con el fin de garantizar la ausencia de inhibidores que afecten el crecimiento microbiano, la leche en polvo utilizada en los experimentos fue sometida previamente a un análisis para detectar posibles sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano, para ello se utilizó la prueba del Delvotest® SP (Gist-brocades).

Con la muestra de cada tubo incubado, se procedió en primera instancia a la extracción aséptica de una alícuota de 1,0 mL, con la cual se efectuó la siembra en profundidad y los contajes según la metodología APHA [1]. Los resultados se reportaron como Log (UFC/mL) para su inclusión en los modelos matemáticos a utilizar.

El medio utilizado para el cultivo fue el M-17 (Difco), con glicerofosfato como controlador de pH, el azúcar incorporado

fue lactosa al 10%, la cual se añadió en forma estéril al medio previamente tratado a 121°C/15 min. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para el microorganismo en cuestión y fue originalmente descrita por Terzaghi y Sandine [16].

Análisis del modelo primario

Los datos del crecimiento para cada temperatura fueron incorporados como variable dependiente en el modelo de crecimiento de Gompertz de cuatro parámetros (Ec. 1) [10], mientras que el tiempo de incubación (t) se incorporó como variable independiente.

Luego se introdujo la ecuación correspondiente al modelo descrito y sus variables al computador utilizando el módulo NONLIN del paquete estadístico Systat [2] y se efectuó el proceso analítico hasta encontrar el punto de convergencia, en el cual los parámetros de regresión (A, D, B y M) consiguen una magnitud apropiada, ajustando de la mejor forma posible la relación entre las variables.

El proceso de ajuste utiliza una modificación del proceso matemático de Gauss-Newton para la disminución del error en la suma de cuadrados en cada proceso iterativo al aplicar la ecuación de regresión no lineal.

$$\log N = A + D \times \exp \left[-\exp(-B \times (\text{Tiempo} - M)) \right] \quad (1)$$

donde;

log N: es el logaritmo común de poblaciones bacterianas (UFC/mL).

Tiempo: de incubación, es la variable independiente (horas).

A, D, B son los parámetros de ajuste del modelo y representan a efecto del inicio del ciclo computacional iterativo: **A** es el logaritmo común de la población inicial en UFC/mL (inóculo); **D** es el logaritmo común de la diferencia entre la población inicial y final en la fase estacionaria; **B** representa la pendiente de la curva y describe la tasa de crecimiento; y **M** es el tiempo en el cual la tasa de crecimiento es de mayor magnitud.

Este proceso permitió disminuir a un mínimo la diferencia entre los datos experimentales y los valores ajustados por el modelo los cuales se describen como residuales. La verificación de la bondad de los modelos empleados en cada caso, se llevó a cabo mediante la construcción de gráficos, en los cuales se contrastaron las curvas ajustadas con los valores de las poblaciones observadas para cada temperatura.

Utilizando los parámetros de ajuste del modelo de Gompertz, se calcularon la fase de adaptación (λ), la tasa máxima de crecimiento exponencial (μ_m) y el tiempo de generación (Tg), como descriptores microbiológicos a ser utilizados para

efectos de predicción de la población en un tiempo dado y en cada temperatura incluida en el rango de estudio (9-39°C), a tal efecto, se utilizaron las siguientes expresiones matemáticas [10]:

– Fase de adaptación (λ):

$$[h] = M - 1/B + ((\log N - A)/((B \times D)/\exp(1))) \quad (2)$$

– Tasa específica de crecimiento (μ_m):

$$[\log (\text{UFC/mL})/h] = B \times D/\exp (1) \quad (3)$$

– Tiempo de generación (Tg):

$$[h] = \exp(1) \times \log (2)/B \times D \quad (4)$$

Análisis del modelo secundario

La fase de adaptación (λ), tasa máxima de crecimiento exponencial (μ_m) y tiempo de generación (Tg) fueron incorporados a los modelos secundarios que mejor ajustaron sus valores en todo el rango térmico estudiado y en los cuales se integraron los datos provenientes de todas las temperaturas en estudio. Así, el modelo hiperbólico utilizado para modelar la fase de adaptación fue bastante sencillo y de fácil ajuste, el mismo es presentado en la literatura para modelar el logaritmo neperiano de la fase de adaptación [10, 20]:

$$\lambda = p / (\text{Temperatura} - q) \quad (5)$$

donde p y q representan los parámetros de ajuste de la ecuación.

Para modelar el efecto de la temperatura sobre la tasa específica de crecimiento (μ_m) se utilizó el modelo de la raíz cuadrada [13], modificada por Ratkowsky para su uso incluso mas allá de la temperatura óptima de crecimiento. La ecuación de regresión no lineal utilizada en el proceso iterativo hasta lograr la menor suma de residuales, fue la siguiente:

$$\sqrt{\mu_m} = (b \times (\text{Temp.} - T_{min})) \times (1 - \exp (c * \text{Temp.} - T_{max})) \quad (6)$$

donde b y c son los parámetros de regresión del modelo; y T_{min} y T_{max} corresponden a las temperaturas mínima y máximas a las cuales puede crecer la cepa de *L. lactis* estudiada, siendo ajustados también por el modelo.

El tiempo de generación o tiempo de doblaje, fue muy bien descrito por un modelo hiperbólico, el mismo fue utilizado en virtud de la forma de la curva representativa del tiempo de generación contra la temperatura de incubación, la ecuación utilizada para describir tal interacción fue similar a la utilizada para la fase de adaptación;

$$Tg = p / (\text{Temperatura} - q) \quad (7)$$

donde p representa la disminución del tiempo de generación en la medida en que se aumenta la temperatura y q representa la temperatura a la cual el tiempo de generación es infinito.

Una vez obtenidos todos los puntos experimentales, se efectuó el análisis de regresión no lineal correspondiente a todos los modelos secundarios descritos hasta obtener el mejor ajuste, obteniéndose así los descriptores de crecimiento definitivos que resultan válidos a cualquier temperatura dentro del rango entre los 9 y 39°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Modelo primario

En la TABLA I, se resumen los parámetros de ajuste, A, D, B y M, obtenidos como salida del proceso iterativo para cada conjunto de datos, agrupados por temperatura.

Puede apreciarse como los valores del R^2 corregido son bastante elevados, lo cual deja claro la bondad del modelo para el ajuste de los datos analizados, sin embargo, es bueno aclarar que en este caso el coeficiente de determinación por sí solo, no es concluyente para el análisis de este tipo de modelo, lo cual representa una importante diferencia con el análisis de modelos de regresión lineal, razón por la cual se incluye también el análisis de residuales [12].

En la TABLA I, se presenta como residual para cada conjunto de datos, la sumatoria de los residuales para cada punto de observación, de esta forma se detectó que, por ejemplo, entre las poblaciones observadas y ajustadas a 33°C, se presenta una sumatoria de residuales de 0,041 con 9 observaciones, con un promedio de 0,0046 (0,041/9) para

cada observación, luego, si se toma en cuenta que para cada observación (Log UFC/mL) hay valores entre 3,0 y 9,0, se puede concluir que al menos para este caso, el error es bastante aceptable. Para el resto de las temperaturas se puede apreciar que la magnitud de los residuales en relación al número de observaciones (n), presentan una situación similar a la descrita.

En la TABLA II, se encuentran los parámetros microbiológicos más importantes que pueden derivarse de la aplicación del modelo de regresión utilizado, cuyas ecuaciones fueron previamente descritas y representan la culminación del modelo primario de predicción. A partir de estos parámetros fue posible abordar los modelos secundarios, con los cuales se logró apreciar cómo los parámetros derivados del modelo primario varían con respecto a las variables que afectan el crecimiento, en este caso, la temperatura.

Como era de esperarse, la fase de retardo (λ) y el tiempo de generación (T_g) se hacen mínimos cuando la temperatura se acerca al óptimo, aumentando gradualmente conforme la temperatura se aleja de este punto, mientras que la tasa máxima de crecimiento exponencial (μ_m) muestra un comportamiento inverso, dada su naturaleza. Los valores resaltados en la columna de la fase de retardo, son producto de la falla en los conjuntos de datos correspondientes (15 y 21°C), para adaptarse a la forma sigmoideal típica que se presentan normalmente en los gráficos de crecimiento bacteriano, esto puede apreciarse más claramente en las curvas de crecimiento que se presentan más adelante.

Al utilizar los gráficos para establecer la fase de adaptación, se puede apreciar que en esos dos casos citados anteriormente, la proyección de una línea recta tangencial a la lí-

TABLA I
PARÁMETROS DE AJUSTE DEL MODELO PRIMARIO

Temp. (°C)	A	D	B	M	R^2 Corregido	Σ Resid.	n	Σ Res/n
9	2,172	7,826	0,010	84,933	0,976	1,612	15	0,107
12	2,324	7,140	0,030	25,553	0,992	0,408	14	0,029
15	2,570	6,382	0,080	9,896	0,986	0,537	10	0,053
18	2,646	7,298	0,083	14,642	0,997	0,245	14	0,017
21	2,505	7,026	0,126	5,790	0,993	0,292	11	0,027
24	3,604	6,063	0,197	7,299	0,998	0,100	12	0,008
27	3,045	6,486	0,234	4,003	0,995	0,196	9	0,022
30	3,664	5,746	0,312	4,217	0,997	0,122	10	0,012
33	3,261	6,624	0,262	3,863	0,999	0,041	9	0,005
36	4,038	5,237	0,409	3,712	0,999	0,023	9	0,003
39	3,123	5,783	0,335	4,355	0,993	0,272	9	0,030

A, D, B y M: representan los parámetros de ajuste. R^2 Corregido: representa el coeficiente de determinación. Σ Resid: es la sumatoria de los residuales. n: es el número de muestras de cada curva.

TABLA II
FASE DE ADAPTACIÓN, TASA DE CRECIMIENTO MÁXIMA Y TIEMPO DE GENERACIÓN PARA CADA TEMPERATURA

Temperatura (°C)	λ (h)	μ_m log [UFC/mL] / h]	Tg (h)
9	7,441	0,029	11,942
12	4,618	0,079	3,820
15	-1,140	0,188	1,519
18	2,832	0,223	1,350
21	-0,277	0,326	0,856
24	2,419	0,439	0,686
27	0,149	0,558	0,505
30	1,238	0,660	0,457
33	0,613	0,638	0,470
36	1,363	0,788	0,382
39	1,620	0,713	0,421

Los valores resaltados no se tomaron en cuenta por ser negativos, para modelar la fase de adaptación.

nea de crecimiento exponencial, hasta el eje de las ordenadas (tiempo), reflejaría una fase de adaptación con magnitud negativa, lo cual es posible desde el punto de vista matemático, sin embargo, desde el punto de vista microbiológico, significaría que no se presentó siquiera un retardo inicial en las curvas de crecimiento en cuestión. Este "defecto" sólo se observa en estos dos casos y por lo tanto no representa un problema intrínseco del modelo y justifica la no incorporación de los datos referidos para el desarrollo del modelo secundario referido a la fase de adaptación.

Para hacer una mejor evaluación del ajuste del modelo utilizado y lograr al mismo tiempo apreciar el problema planteado en el párrafo anterior, se presentan las FIGS. 1-11, correspondientes a las curvas de crecimiento obtenidas a cada temperatura y los valores estimados obtenidos como resultado al utilizar el modelo, en ellos se puede corroborar gráficamente como los tiempos calculados para la fase de adaptación se corresponden con la realidad, resultando la única excepción los dos casos discutidos en el párrafo anterior.

Modelo secundario

Los modelos secundarios aplicados para cada uno de los parámetros de interés microbiológico se utilizaron según mejor se adaptaban a cada caso, así, se encontró que los tiempos de la fase de adaptación eran bien ajustados por el modelo hiperbólico, tal como había sido presentado en trabajos previos con modelos cinéticos [20], por su parte la tasa de crecimiento fue muy bien ajustada por el modelo modificado de la raíz cuadrada [13]. En el caso del tiempo de generación, se observó que al graficar el mismo contra la temperatura, describía una hipérbola casi perfecta, por lo cual se aplicó el mismo modelo hiperbólico empleado para la fase de adapta-

ción, lo cual no había sido descrito en ninguna de las referencias analizadas.

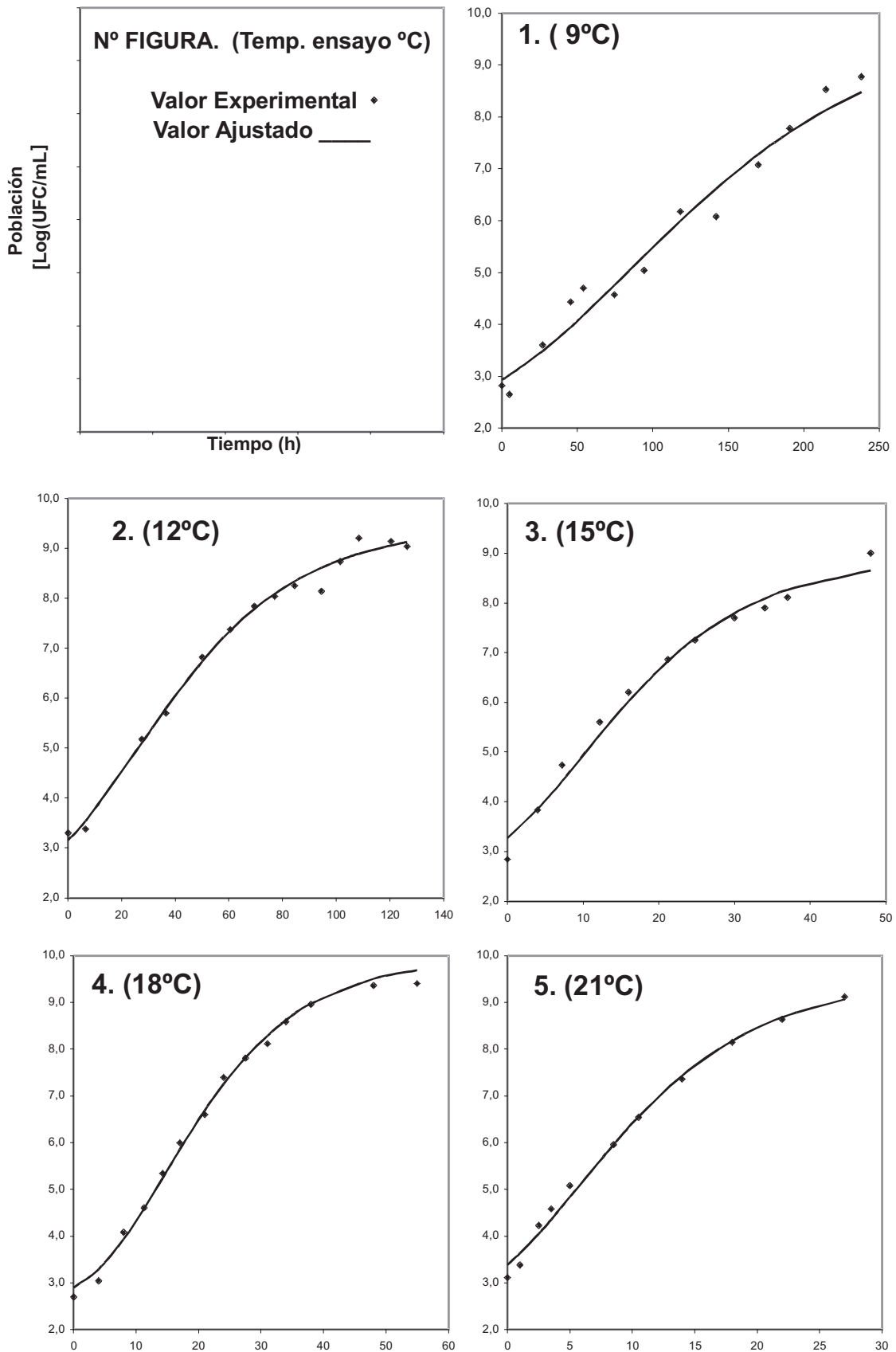
Modelo hiperbólico para la fase de adaptación (λ)

Luego de efectuar los ajustes a través del paquete estadístico utilizado en este trabajo, se consiguió que el modelo ajustaba mejor al utilizar los tiempos de adaptación sin transformación logarítmica, lo cual no se encontró en ninguno de los trabajos revisados. El modelo matemático utilizado en definitiva puede resumirse en el desarrollo de la Ec. 5 de la siguiente forma:

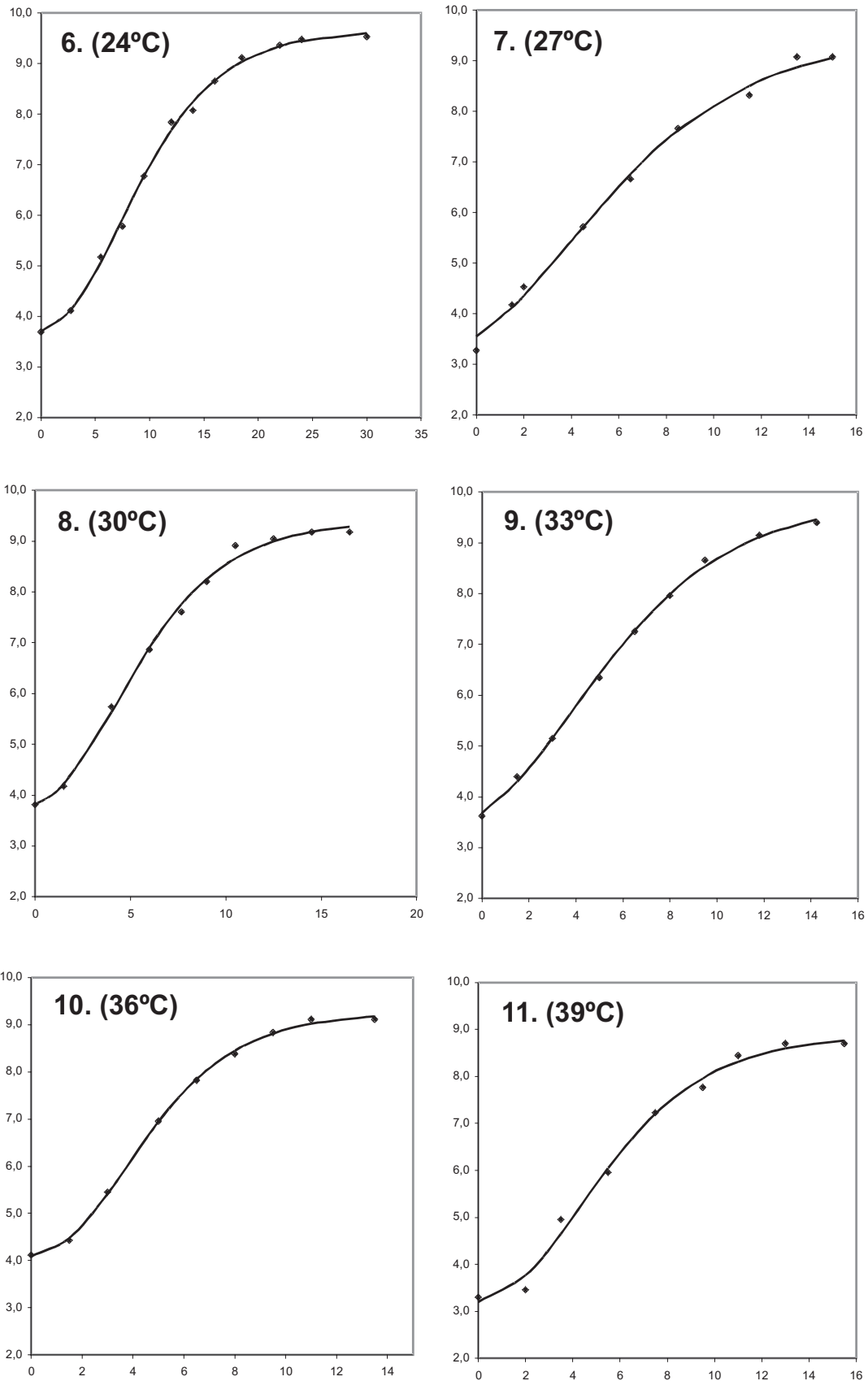
$$\lambda = 34,324 / (\text{Temperatura} - 4,416) \quad (8)$$

En la TABLA III, se presentan el resultado de los parámetros p y q obtenidos de la aplicación del modelo, con su respectivo intervalo de confianza, en el cual puede apreciarse, que en ninguno de los casos, dicho intervalo incluye el valor cero, lo cual, según explican Ato y Lopez [2], valida la pendiente e intercepción del modelo aplicado. Sin embargo, puede observarse que los intervalos incluyen valores bastante distantes del estimado para lograr la confianza del 95%, lo cual puede explicarse, al menos parcialmente, por la poca cantidad de observaciones realizadas.

En la TABLA IV, se presentan los tiempos obtenidos como fase de adaptación o retardo para cada una de las temperaturas, los tiempos estimados por el modelo hiperbólico aplicado y los residuales encontrados para cada caso, mientras que en la FIG. 12, se representan los valores estimados y de origen para este modelo, el cual arrojó un R² de 0,922 que si bien es inferior al de los otros modelos utilizados en este trabajo, tiene un excelente ajuste.



FIGURAS 1-5. VALORES EXPERIMENTALES Y MODELOS DE CRECIMIENTO DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A DIFERENTES TEMPERATURAS.



FIGURAS 6-11. VALORES EXPERIMENTALES Y MODELOS DE CRECIMIENTO DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A DIFERENTES TEMPERATURAS.

TABLA III
ESTIMADORES DEL MODELO HIPERBÓLICO PARA LA FASE DE ADAPTACIÓN

Parámetro	Estimado	Intervalo de Confianza (95%)	
		Inferior	Superior
p	34,324	11,659	49,990
q	4,416	1,903	6,929

TABLA IV
FASE DE ADAPTACIÓN ESTIMADA POR EL MODELO HIPERBÓLICO, VALORES DE ORIGEN Y RESIDUALES

Temperatura (°C)	λ	Estimado (λ)	Residual
9	7,441	7,448	-0,047
12	4,618	4,526	0,092
15		3,243	
18	2,832	2,527	0,305
21		2,070	
24	2,419	1,753	0,666
27	0,149	1,520	-1,371
30	1,238	1,342	-0,104
33	0,613	1,201	-0,588
36	1,363	1,087	0,276
39	1,620	0,992	0,628

Los valores resaltados son estimados obtenidos para las temperaturas cuyos valores de origen fueron excluidos. R^2 (corregido) = 0,922.

En la FIG. 12, correspondiente al modelo secundario para la fase de adaptación, se aprecia como la línea de ajuste, sí representa un buen estimado de los puntos de origen, los cuales describen una hipérbola.

Modelo para la tasa máxima de crecimiento exponencial (μ_m)

En la TABLA V, se presentan los parámetros estimados por el modelo de la raíz cuadrada con sus respectivos intervalos de confianza, en los que puede apreciarse que los valores estimados para los cuatro parámetros (b , c , T_{min} y T_{max}) se encuentran en un rango estimado para el intervalo de confianza bastante estrecho, lo cual infiere precisión al modelo.

Como producto del desarrollo experimental de la ecuación 6, integrando los estimadores presentados en la TABLA V, se obtuvo la siguiente ecuación de predicción:

$$\sqrt{\mu_m} = (0,042 * (T - 4,39)) * (1 - \exp(0,05 * (T - 56,5))) \quad (9)$$

Por otra parte, en la TABLA VI se presentan los resultados estimados para la tasa específica de crecimiento según el modelo primario, los estimados al aplicar el modelo secundario, así como las diferencias entre ambos para cada temperatura (residuales). Los mismos valores del modelo estimado y los obtenidos del modelo de Gompertz se encuentran representados en la FIG. 13.

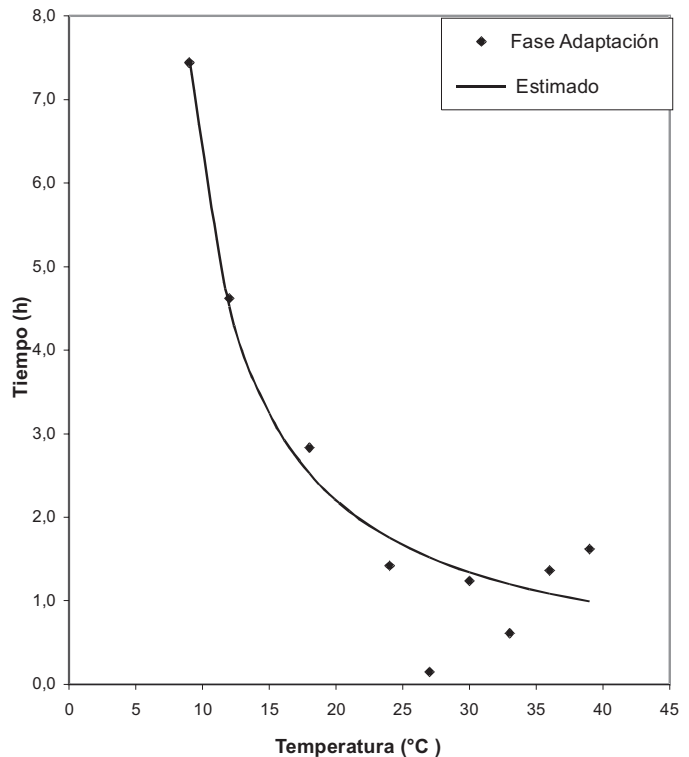


FIGURA 12. MODELO HIPERBÓLICO PARA LA FASE DE ADAPTACIÓN DE *L. lactis* subsp. *lactis*.

TABLA V
ESTIMADORES DEL MODELO DE LA RAÍZ CUADRADA PARA LA TASA MÁXIMA DE CRECIMIENTO EXPONENCIAL

Parámetro	Estimado	Intervalo de Confianza (95%)	
		Inferior	Superior
b	0,042	0,022	0,062
c	4,390	2,233	6,547
T _{min}	0,050	0,014	0,113
T _{max}	56,500	44,034	68,966

b, c, T_{min} y T_{max} son parámetros de regresión de la ecuación.

TABLA VI
RAÍZ CUADRADA DE LA TASA MÁXIMA DE CRECIMIENTO EXPONENCIAL, VALORES DE ORIGEN Y RESIDUALES

Temperatura (°C)	μ _m (Origen)	Estimado	Residual
9	0,170	0,177	-0,007
12	0,281	0,288	-0,007
15	0,434	0,393	0,041
18	0,472	0,492	-0,020
21	0,571	0,584	-0,013
24	0,663	0,667	-0,004
27	0,747	0,738	0,009
30	0,812	0,796	0,016
33	0,799	0,836	-0,037
36	0,888	0,857	0,031
39	0,844	0,853	-0,009

R² (corregido) = 0,991.

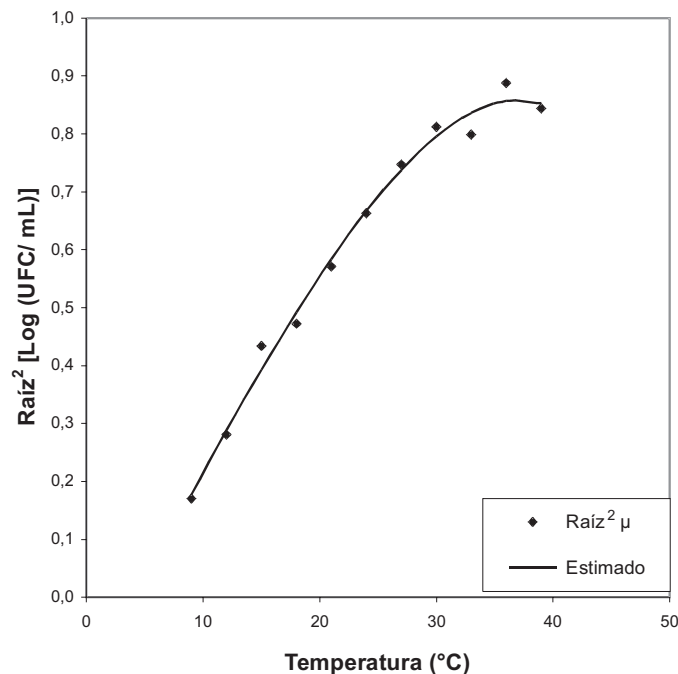


FIGURA 13. MODELO DE RATKOWSKY PARA TASA MÁXIMA DE CRECIMIENTO DE *L. lactis* subsp. *lactis*.

Al analizar los residuales es posible establecer que las magnitudes de los mismos son pequeños y los mismos no exhiben un patrón determinado, ya que se ubican en algunos casos por arriba, mientras que en otros casos lo hacen por debajo del estimado, por lo cual se concluye que el modelo aplicado funcionó bastante bien, lo cual una vez más es corroborado con un sólido R² = 0,991.

En la FIG. 13 se logra apreciar lo señalado en el párrafo anterior, la línea sólida correspondiente al modelo ajustado presenta una relación muy cercana a los puntos correspondientes a las tasas máximas de crecimiento exponencial obtenidas del modelo primario, sólo puede objetarse a este respecto, el punto correspondiente a la temperatura de los 33°C, el cual queda un poco por debajo del la línea de ajuste, pero se puede inferir que este valor es aparentemente atípico al compararlo con los puntos superior e inferior.

Modelo hiperbólico para el tiempo de generación (Tg)

En la TABLA VII, se presentan los parámetros estimados del modelo, tomados de la Ec. 7, donde se aprecian las magnitudes de p y q, con sus respectivos intervalos de confianza. Al incluir los estimadores obtenidos de esta TABLA en

la Ec. 7, se obtiene la ecuación de predicción para el tiempo de generación;

$$T_g = 14,288 / (Temperatura - 7,638) \quad (10)$$

En la TABLA VIII, se presentan los tiempos de generación obtenidos del modelo primario, los estimados por el modelo y los residuales correspondientes, en la misma se puede apreciar, que existe un ajuste muy bueno entre los estimados por el modelo y los datos de origen, es decir, los obtenidos del modelo primario. Sin embargo, se aprecia cierta tendencia del modelo ajustado a sobreestimar el parámetro en estudio en casi todas las temperaturas, esto puede evidenciarse por la dispersión de los residuales por debajo del estimado, por lo cual los residuales son casi siempre negativos.

Este hallazgo no pudo ser comparado con otros trabajos puesto que no se encontró en la bibliografía la aplicación de ecuaciones hiperbólicas para modelar el tiempo de generación.

En cuanto a los valores obtenidos para el tiempo de generación para el *L. lactis*, se puede decir que los mismos son bastante similares a los reportados por Langeveld y Cuperus [7]. Estos autores calcularon un tiempo de generación específico de 0,67 horas a 27°C y en condiciones similares a las empleadas en este trabajo, con la salvedad de que los autores ci-

tados no calcularon el tiempo mínimo de generación, sino el tiempo de generación en la fase exponencial de crecimiento; vale decir, no utilizaron el modelo de Gompertz para el ajuste de las curvas de crecimiento.

El coeficiente de determinación R^2 corregido obtenido para este modelo fue de 0,991, similar al obtenido en el modelo de la raíz cuadrada, lo cual deja bastante claro que existió un buen ajuste. Por otra parte, es importante destacar que, tanto el tiempo mínimo de generación, como la tasa máxima de crecimiento exponencial, representan parámetros microbiológicos descriptivos de la velocidad de crecimiento del microorganismo en el medio o alimento, en este caso leche, estando ambos relacionados matemáticamente, por lo cual, basta con modelar uno de ellos para lograr una función predictiva. En el presente trabajo el modelo de la raíz cuadrada de la tasa de crecimiento parece más apropiado para describir la relación entre la velocidad de crecimiento y la temperatura dentro del rango estudiado, por presentar menor magnitud total de residuales y con una mejor distribución de los mismos.

En la FIG. 14, se puede observar el ajuste del modelo con los tiempos de generación obtenidos del modelo primario para cada temperatura. En esta, se evidencia la capacidad del modelo utilizado y de los estimadores empleados para calcular la relación entre ese parámetro y la temperatura.

TABLA VII
ESTIMADORES DEL MODELO HIPERBÓLICO PARA EL TIEMPO DE GENERACIÓN

Parámetro	Estimado	Intervalo de Confianza (95%)	
		Inferior	Superior
p	14,288	11,997	16,580
q	7,638	7,403	7,874

TABLA VIII
TIEMPO DE GENERACIÓN, VALORES DE ORIGEN Y RESIDUALES

Temperatura (°C)	Tg (Origen) (h)	Estimado (h)	Residual
9	10,456	10,492	-0,036
12	3,820	3,276	0,544
15	1,603	1,941	-0,338
18	1,351	1,379	0,028
21	0,924	1,069	-0,145
24	0,685	0,873	-0,188
27	0,539	0,738	-0,199
30	0,456	0,639	-0,183
33	0,472	0,563	-0,091
36	0,422	0,504	-0,122
39	0,421	0,456	-0,034

R^2 (corregido) = 0,991.

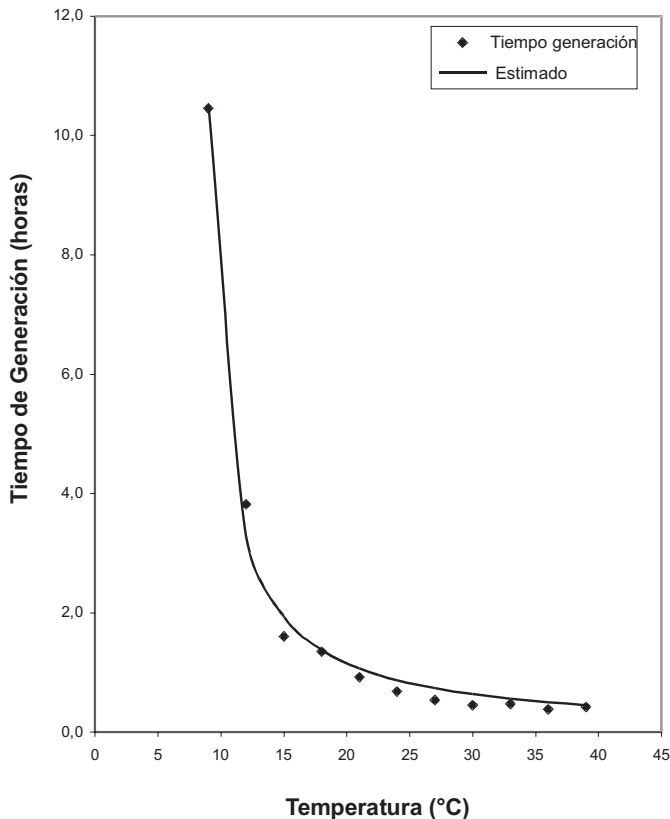


FIGURA 14. MODELO HIPERBÓLICO PARA EL TIEMPO DE GENERACIÓN DE *L. lactis* subsp. *lactis*.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los modelos aplicados para describir las curvas de crecimiento del *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, fueron muy precisos para describir las etapas del crecimiento bacteriano estudiadas, es decir, el modelo primario utilizando la ecuación de Gompertz permite la predicción del crecimiento en cada una de las temperaturas ensayadas.

Los modelos secundarios utilizados en este trabajo resultaron apropiados para describir los parámetros microbiológicos que permiten predecir la cinética de crecimiento del microorganismo en estudio.

Se recomienda verificar las ecuaciones propuestas con alguna de las cepas del *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* productoras de nisina, ya que esta bacteriocina ha resultado sumamente útil en la preservación de los productos lácteos, incluso, resultaría más importante relacionar la producción de este metabolito con la cinética de crecimiento de la bacteria estudiada controlando otras variables de crecimiento (pH, concentración de sal, actividad de agua y otras).

Finalmente, resultaría importante utilizar los modelos propuestos en este trabajo para tratar de describir el crecimiento del *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en otros productos

lácteos, debido a que su utilidad como biopreservador sería importante en productos como quesos frescos o leche pasteurizada.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar el más profundo agradecimiento al Decanato de Postgrado de la Universidad Simón Bolívar (USB) y a la División de Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia por el financiamiento otorgado para la realización de este estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of Methods for the microbiological examination of food**. 3rd Ed. 75-95 pp. 1996.
- [2] ATO, M.; LÓPEZ, J.J. **Fundamentos de Estadística con SYSTAT**. Addison Wesley Iberoamericana, S.A. Delaware-USA. 630 pp.1994.
- [3] CACHON, R.; DIVÍES, C. Modeling of growth and lactate fermentation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *Diacetylactis* in batch culture. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 40(1): 28-33. 1993.
- [4] DAVIDSON, P.; HOOVER, D. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: **Lactic Acid Bacteria**. Salminen S.; Von Wright A (Eds.) Academic Press, San Diego, California. 96-114 pp. 1993.
- [5] DEMARIGNY, Y.; JUILLARD, V.; DESCHAMPS, N.; RICHARD, J. Comparison of three practical methods for studying the kinetics of lowering the pH of milk by culturing with strains of *Lactococcus lactis*. **Lait**. 74(1): 23-32. 1994.
- [6] KIM, W.S.; MAY, R.J.; DUNN, N.W. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 48(4): 449-453. 1997.
- [7] LANGEVELD, L.P.; CUPERUS, F. The relation between temperature and growth rate in pasteurized milk of different types of bacteria which are important to the deterioration of that milk. **Neth. Milk Dairy J.** 37: 244-245. 1980.
- [8] MÄYRÄ-MÄKINEN, A.; BIGRET, M. Industrial use and production of lactic acid bacteria. Chapter 2. In: **Lactic Acid Bacteria**. Salminen S.; Von Wright A. (Eds.). Academic Press, San Diego, California. 65-95 pp. 1993.
- [9] MCMEEKIN, T.A.; OLLEY, J.N.; ROSS, T.; RATKOWSKY, D.A. **Predictive Microbiology: Theory and Application**. Research Studies Press, LTD., Taunton, England. 358 pp. 1993.

- [10] MCMEEKIN, T.A.; ROSS, T. Modeling applications. **J. Food Prot.** 59 (Supl.): 37-42. 1996.
- [11] MIRÓ, A.; RIOS, M. Calidad Microbiológica de los Quesos Blancos Venezolanos Analizados en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Periodo Enero 1988 a Junio 1998. **Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"**. 30: 14-20. 1999.
- [12] NETER, J.; KUTNER, M.; NACHTSHEIM, C.; WASSERMAN, W. **Applied Linear Statistical Models**. 4th Ed. Richard D. Irwin, Inc., Chicago. 105-126 pp. 1996.
- [13] RATKOWSKY, D.A.; LOWRY, R.K.; MCMEEKIN, T.A.; STOKES, A.N.; CHANDLER, R.E. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. **J. Bacteriol.** 154(3): 1222-1226. 1983.
- [14] RIOS, M.; NOVOA, M.L. Apoyo del Departamento de Microbiología de Alimentos del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INH "RR") a la Investigación de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). **Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"**. 30: 8-13. 1999.
- [15] ROBERTS, T.A. Microbial growth and survival: developments in predictive modeling. **Food Technol.** 51(4): 88-90. 1997.
- [16] TERZAGHI, B.E.; SANDINE, W.E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. **Appl. Microbiol.** 29 (6): 807-813. 1975.
- [17] WHITING, R.C.; BUCHANAN, R.L. Microbial modeling. **Food Technol.** 48 (6): 113-120. 1994.
- [18] WIJZES, T.; WIT, J.C.; HUIS, J.H.; VANT RIET, K.; ZWIETERING, M.H. Modelling bacterial growth of *Lactobacillus curvatus* as a function of acidity and temperature. **Appl. Environ. Microbiol.** 61(7): 2533-2539. 1995.
- [19] ZWIETERING, M.H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F.M.; VAN'T RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. **Appl. Environ. Microbiol.** 56(6): 1875-1881. 1990.
- [20] ZWIETERING, M.H.; DE KOOS, J.T.; HASENACK, B.E.; DE WIT, J.C.; VAN'T RIET, K. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 1094-1101. 1991.
- [21] ZWIETERING, M.H.; CUPPERS, H.G.; DE WIT, J.C.; VAN'T RIET, K. Evaluation of data transformation and validation of a model for the effect of temperature on bacterial growth. **Appl. Environ. Microbiol.** 60(1): 195-203. 1994.