

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



TESIS

**AJUSTE DE MODELOS MATEMÁTICOS DE CRECIMIENTO DE
BACTERIAS LÁCTICAS EN QUESO TIPO PARIA EN CONDICIONES
ISOTÉRMICAS Y NO ISOTÉRMICAS**

PRESENTADA POR:

Bach. RONALD FERNANDO SANCHO MAMANI

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

PUNO – PERU

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

**AJUSTE DE MODELOS MATEMATICOS DE CRECIMIENTO DE
BACTERIAS LÁCTICAS EN QUESO TIPO PARIA EN CONDICIONES
ISOTÉRMICAS Y NO ISOTÉRMICAS.**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. RONALD FERNANDO SANCHO MAMANI

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

APROBADA POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE

.....


Dr. Wenceslao Teddy MEDINA ESPINOZA

PRIMER MIEMBRO

.....


Ing. M.Sc. Luis Alberto JIMENEZ MONROY

SEGUNDO MIEMBRO

.....


Ing. Saïre Roenfi GUERRA LIMA

DIRECTOR DE TESIS

.....


Ing. M.Sc. Florentino Victor CHOQUEHUANCA CÁCERES

ASESOR DE TESIS

.....

Ing. M.Sc. Thomas ANCCO VIZCARRA

PUNO – PERU

2015

Área: Ingeniería y tecnología

Tema: Desarrollo de procesos y productos agroindustriales sostenibles y eficientes

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios pues
quien en El cree todo lo puede y
mis seres más queridos mi familia
por estar siempre presentes



AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme concretizar mis sueños y dar un paso más en mi camino.

Al alma mater de la enseñanza en la Región de Puno la Universidad Nacional del Altiplano y mi querida Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial.

A mis jurados de tesis al Dr. Wenceslao Teddy Medina Espinoza, al Ing. M.Sc. Luis Alberto Jimenez Monrroy, al Ing. Saire Roenfi Guerra Lima, por su sabia enseñanza y contribución, críticas, sugerencias y correcciones para la culminación de esta investigación.

A mi Director de tesis el Ing. M.Sc. Florentino Victor Choquehuanca Cáceres, por su constante apoyo.

A mi Asesor de tesis el Ing. M.Sc. Thomas Ancco Vizcarra, quien desde lo lejos supo orientarme y contribuir para la mejora de esta investigación, muchas gracias ingeniero estaré profundamente agradecido.

Al señor Pablo por el apoyo brindado durante el tiempo de ejecución de este trabajo de investigación.

Al Instituto Nacional de Investigación Agraria ILLPA INIA PUNO. Por permitirme trabajar con la materia prima de su estable, al señor Hugo jefe de la planta piloto del INIA por todas las facilidades brindadas.

A mis padres, Román y Estela, por el ejemplo de vida, amor, bondad, esfuerzo y apoyo

INDICE GENERAL

| | |
|---|----------|
| INDICE GENERAL..... | I |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | IV |
| ÍNDICE DE FIGURAS | V |
| ÍNDICE DE ANEXOS | VI |
| ÍNDICE DE SIGLAS | VII |
| RESUMEN..... | VIII |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. REVISIÓN DE LITERATURA. | 3 |
| 2.1 LECHE | 3 |
| 2.2 QUESO..... | 3 |
| 2.3 QUESO TIPO PARIA | 3 |
| 2.4 BACTERIAS LÁCTICAS..... | 4 |
| 2.4.1 CULTIVOS LÁCTICOS INICIADORES..... | 4 |
| 2.4.2 LACTOCOCCUS..... | 5 |
| 2.5 MADURACION EN QUESOS | 6 |
| 2.6 CRECIMIENTO BACTERIANO | 7 |
| 2.7 CURVA DE CRECIMIENTO..... | 7 |
| 2.7.1 FASES DE CRECIMIENTO MICROBIANO..... | 9 |
| 2.8 PARAMETROS DE CRECIMIENTO..... | 10 |
| 2.8.1 TIEMPO DE ADAPTACIÓN (λ)..... | 10 |
| 2.8.2 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO (μ)..... | 10 |
| 2.8.3 LA POBLACION MÁXIMA (N_{max})..... | 11 |
| 2.9 IMPORTANCIA DE LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO | 11 |
| 2.10 CONDICIONES ISOTÉRMICAS..... | 12 |
| 2.11 MODELAMIENTO MATEMATICO Y MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA. | 12 |
| 2.11.1 MICROBIOLOGIA PREDICTIVA | 12 |
| 2.11.2 MODELAMIENTO MATEMATICO..... | 13 |
| 2.11.3 CLASIFICACIÓN DE LOS MODELOS MATEMATICOS..... | 13 |
| 2.11.4 MODELOS CINÉTICOS Y PROBABILÍSTICOS | 14 |
| 2.11.4.1 MODELO PROBABILISTICO..... | 14 |
| 2.11.4.2 MODELOS CINETICOS. | 14 |
| 2.11.4.3 MODELOS EMPÍRICOS Y MECANICISTAS | 14 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.11.4.4 | MODELOS PRIMARIOS, SECUNDARIOS Y TERCARIOS..... | 15 |
| 2.11.4.5 | MODELOS PRIMARIOS | 15 |
| 2.11.4.6 | MODELOS SECUNDARIOS | 19 |
| 2.11.4.7 | MODELOS NO ISOTERMICOS..... | 21 |
| 2.12 | ANALISIS DE DATOS PARA MODELAMIENTO MATEMATICO | 25 |
| 2.12.1 | DESARROLLO, COLECCIÓN DE DATOS Y VALIDACIÓN DE LOS MODELOS..... | 25 |
| 2.12.2 | DISEÑO Y PLANTEAMIENTO DE LOS MODELOS..... | 25 |
| 2.12.2.1 | ACUMULACIÓN DE DATOS..... | 27 |
| 2.12.2.2 | AJUSTE DE LOS DATOS..... | 28 |
| 2.13 | COMPARACIÓN MATEMÁTICA..... | 28 |
| 2.13.1 | COEFICIENTE DE REGRESIÓN MÚLTIPLE | 29 |
| 2.13.2 | INDICES MSE Y RMSE..... | 29 |
| 2.13.3 | INDICES SESGO Y EXACTITUD | 30 |
| 3. | MATERIALES Y METODOS DE INVESTIGACION..... | 32 |
| 3.1 | LUGAR DE EJECUCION..... | 32 |
| 3.2 | MATERIAL EXPERIMENTAL..... | 32 |
| 3.2.1 | Materia prima..... | 32 |
| 3.2.2 | Insumos:..... | 32 |
| 3.2.3 | Utensilios:..... | 32 |
| 3.2.4 | Materiales de laboratorio..... | 32 |
| 3.2.5 | Reactivos | 33 |
| 3.2.6 | Medios de cultivo | 33 |
| 3.2.7 | Equipos..... | 33 |
| 3.3 | METODOLOGÍA EXPERIMENTAL..... | 34 |
| 3.3.1 | DIAGRAMA EXPERIMENTAL..... | 34 |
| 3.3.2 | PROCEDIMIENTO DEL DIAGRAMA EXPERIMENTAL | 35 |
| 3.3.3 | MÉTODOS DE ANÁLISIS | 39 |
| 3.3.3.1 | MICROORGANISMO Y EL MEDIO DE CULTIVO | 39 |
| 3.3.3.2 | PREPARACIÓN DE LA MUESTRA..... | 40 |
| 3.3.3.3 | PREPARACIÓN DE DILUCIONES | 40 |
| 3.3.3.4 | PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO | 40 |
| 3.3.3.5 | SIEMBRA EN PLACA | 41 |
| 3.3.3.6 | RECuento DE BACTERIAS LÁCTICAS (LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS Y LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. CREMORIS)..... | 41 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.3.3.7 | OBTENCIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y LOS PARÁMETROS DE CRECIMIENTO | 41 |
| 3.3.3.8 | AJUSTE DE MODELOS MATEMÁTICOS | 41 |
| 3.3.4 | UNIDADES DE ANÁLISIS Y OBSERVACIONES | 49 |
| | Variables de estudio..... | 49 |
| | Variables de respuesta..... | 49 |
| 3.4 | MÉTODOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 49 |
| 3.4.1 | DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS EN UFC/ML EN LA MADURACIÓN DEL QUESO TIPO PARIA. | 49 |
| 3.4.2 | DETERMINACIÓN DE PARAMETROS PARA EL AJUSTE DE MODELOS PRIMARIOS EN LA MADURACIÓN DEL QUESO TIPO PARIA. | 50 |
| 4. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 52 |
| 4.1 | OBTENCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE BACTERIAS LÁCTICAS EN QUESO TIPO PARIA MEDIANTE EL AJUSTE DE LOS MODELOS PRIMARIOS..... | 52 |
| 4.1.1 | ANÁLISIS DE LOS PARAMETROS DE AJUSTE DE LA CURVA OBTENIDO A DIFERENTES TEMPERATURAS | 53 |
| 4.1.2 | MODELOS PRIMARIOS | 55 |
| 4.2 | DETERMINACIÓN DEL MODELO SECUNDARIO | 58 |
| 4.3 | MODELOS MATEMÁTICOS EN CONDICIONES DE TEMPERATURA VARIABLES..... | 66 |
| | CONCLUSIONES..... | 71 |
| | RECOMENDACIONES..... | 72 |
| | REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 73 |
| | ANEXOS | 82 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Tabla 1. Requisitos fisicoquímicos del queso tipo paria..... | 4 |
| Tabla 2. Características que diferencian las dos subespecies de <i>Lactococcus lactis</i> | 6 |
| Tabla 3. Modelos Primarios..... | 42 |
| Tabla 4. Modelos Secundarios..... | 43 |
| Tabla 5. Índices Estadísticos..... | 44 |
| Tabla 6. Parametros obtenidos mediante el metodo de lineas..... | 52 |
| Tabla 7. Análisis de varianza (ANOVA) del parámetro N_0 (Log del recuento inicial)..... | 53 |
| Tabla 8. Análisis de varianza (ANOVA) del parámetro A (log del recuento microbiano máximo durante la fase estacionaria menos el Log del recuento inicial)..... | 53 |
| Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) del parámetro B (velocidad de crecimiento relativa en el tiempo)..... | 54 |
| Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA) del parámetro M (tiempo requerido para alcanzar la velocidad de crecimiento máxima)..... | 54 |
| Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) del parámetro N_{max} (recuento microbiano máximo)..... | 54 |
| Tabla 12. Valores e índices estadísticos de diferentes modelos ajustados..... | 55 |
| Tabla 13. Parámetros biológicos derivados del ajuste del modelo primario..... | 58 |
| Tabla 14. Modelos Secundarios Ajustados para cada parámetro de crecimiento de BAL..... | 61 |
| Tabla 15. Los coeficientes de Correlación (R^2) obtenida por ajustes de los Modelos Secundarios..... | 63 |
| Tabla 16. Valores de los parámetros de crecimiento observados (obs) y valores predichos (pred) por el modelo secundarioseleccionado y sus respectivos índices estadísticos sesgo y exactitud..... | 64 |
| Tabla 17. Índices estadísticos para el perfil de temperatura de 9-15°C..... | 67 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1. Curva de crecimiento Bacteriano..... | 8 |
| Figura 2. Diagrama experimental..... | 34 |
| Figura 3. Ajuste de la Ecuacion Raiz Cuadrada para el parámetro μ | 59 |
| Figura 4. Ajuste de la Ecuación de Potencia para “A”..... | 59 |
| Figura 5. Ajuste de la Ecuación Exponencial para el tiempo de latencia “ λ ”..... | 60 |
| Figura 6. Relación entre los parámetros “ λ ” de crecimiento observado vs predicho..... | 65 |
| Figura 7. Relación entre los parámetros “A” de crecimiento observado vs predicho..... | 65 |
| Figura 8. Relación entre los parámetros “ μ ” de crecimiento observado vs predicho..... | 66 |
| Figura 9. Curva de Crecimiento en condiciones no Isotérmicas predictos por el modelo no isotérmico..... | 68 |
| Figura 10. Curva de crecimiento en condiciones isotérmicas y no isotérmicas..... | 70 |
| Figura 11. Modelo de Gompertz modificado a Temperatura de 9°C..... | 83 |
| Figura 12. Modelo Logístico a Temperatura de 9°C..... | 83 |
| Figura 13. Modelo Logístico Modificado a Temperatura de 9°C..... | 83 |
| Figura 14. Modelo de Baranyi y Roberts a Temperatura de 9°C..... | 83 |
| Figura 15. Modelo de Gompertz modificado a Temperatura de 12°C..... | 84 |
| Figura 16. Modelo Logístico a Temperatura de 12°C..... | 84 |
| Figura 17. Modelo Logístico Modificado a Temperatura de 12°C..... | 84 |
| Figura 18. Modelo de Baranyi y Roberts a Temperatura de 12°C..... | 84 |
| Figura 19. Modelo de Gompertz modificado a Temperatura de 15°C..... | 85 |
| Figura 20. Modelo Logístico a Temperatura de 15°C..... | 85 |
| Figura 21. Modelo Logístico Modificado a Temperatura de 15°C..... | 85 |
| Figura 22. Modelo de Baranyi y Roberts a Temperatura de 15°C..... | 85 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | Pág. |
|--|------|
| ANEXO 1. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LOG (UFC/ML) EN FUNCIÓN AL TIEMPO Y TEMPERATURA | 82 |
| ANEXO 2. PREDICCIÓN DEL DE CRECIMIENTO DEL <i>LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS</i> Y <i>LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. CREMORIS</i> EN CONDICIONES ISOTÉRMICAS A DIFERENTES TEMPERATURAS A TRAVÉS DEL MODELO DE GOMPERTZ CADA 6 HORAS. | 82 |
| ANEXO 3. AJUSTE DE LA CURVA DE CRECIMIENTO CON DIFERENTES MODELOS PRIMARIOS | 83 |
| ANEXO 4. PARÁMETROS AJUSTADOS POR DIFERENTES MODELOS PRIMARIOS | 86 |
| ANEXO 5. VALORES DE LOS ÍNDICES DEFINIDOS PARA EL PERFIL DE TEMPERATURA DE 9-15°C | 86 |
| ANEXO 6. PANEL FOTOGRÁFICO EN LA ELABORACIÓN DEL QUESO TIPO PARIÁ | 87 |
| ANEXO 7. PANEL FOTOGRÁFICO DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO | 88 |
| ANEXO 8. FICHA TÉCNICA DEL CULTIVO LÁCTICO | 89 |



ÍNDICE DE SIGLAS

| | |
|-----------------|---|
| μ | : Velocidad específica de Crecimiento |
| λ | : Duración de la fase lag (h) |
| A | : Aumento logarítmico de la población |
| $\mu(T)$ | : Parámetro obtenido a temperatura constante |
| $\lambda(T)$ | : Parámetro obtenido a temperatura constante |
| A(T) | : Parámetro obtenido a temperatura constante |
| $\mu(T(t))$ | : Parámetro obtenido con variación de temperatura |
| $\lambda(T(t))$ | : Parámetro obtenido con variación de temperatura |
| A(T(t)) | : Parámetro obtenido con variación de temperatura |
| Af | : Factor de exactitud |
| B | : Pendiente de la curva (tasa de crecimiento) |
| BAL | : Bacterias Acido Lácticas |
| Bf | : Factor de sesgo |
| DVS | : Uso Directo a la Tina |
| Lc. | : Lactococcus |
| M | : Tiempo en el cual la tasa de crecimiento es de mayor magnitud |
| MPA | : Microbiología predictiva de alimentos |
| MRS | : Man Rugosa Sharpe |
| MSE | : Error Cuadrático Medio |
| NTP | : Norma técnica peruana |
| N_0 | : Recuento inicial de ufc/ml |
| N_{max} | : Recuento final de ufc/ml |
| ODE | : Ecuación diferencial ordinaria |
| pH | : Potencial hidrogeno |
| RMSE | : raíz del Error cuadrático medio |
| R^2 | : Coeficiente de correlación |
| T | : Temperatura |
| T_g | : Tiempo de generación |
| ufc | : Unidad Formadora de Colonia |
| ufc/ml | : Unidades formadoras de colonia por mililitro |
| ANOVA | : Análisis de Varianza |

RESUMEN

La presente investigación se realizó en la Universidad Nacional del Altiplano Puno ubicada a 3827 msnm. El objetivo fue ajustar modelos matemáticos en el crecimiento de bacterias lácticas. Primeramente se elaboró el queso tipo paria con cultivo láctico mixto R-707 HANSEN, de la cepa *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, en la etapa de maduración se realizó las pruebas de análisis bacteriológico en medio de cultivo M17 en tres temperaturas de maduración (9, 12, 15°C), obteniendo los parámetros de la curva crecimiento bacteriano. Fueron ajustados cuatro modelos primarios a las curvas de crecimiento de bacterias para obtenerlos parámetros cinéticos de crecimiento bacteriano (λ , μ , A); luego fueron evaluados y ajustados los parámetros cinéticos de crecimiento en función a la temperatura con los modelos secundarios, los modelos primarios y secundarios fueron ajustados usando el método de Levenberg-Marquardt, con base en los modelos seleccionados (primarios y secundarios), fue establecido y aplicado un modelo de crecimiento no isotérmico, Siendo la solución de esta Ecuación diferencial mediante la resolución numérica por el método de Runge Kutta de cuarto orden con la función ode 45. El modelo primario que presento mejor ajuste a los datos de crecimiento en cada temperatura de estudio fue el modelo de Gompertz con un R^2 muy cercano a uno en las tres temperaturas de estudio (9, 12 y 15°C). La influencia de la temperatura para la fase Lag (λ) fue mejor descrita por el modelo exponencial, la velocidad de crecimiento (μ) por el modelo de la raíz cuadrada, y para el aumento logarítmico de la población (A) el modelo de la Ecuación de potencia. El modelo no isotérmico propuesto fue validado con datos experimentales obteniendo un R^2 de 0.769, MSE de 0.03, factor sesgo de 1.007 y factor exactitud de 1.016. Los modelos utilizados en este estudio son útiles para describir el crecimiento de la cepa *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. Cremoris* en la maduración del queso tipo paria en las temperaturas estudiadas.

PALABRAS CLAVE: Modelos Matemáticos, Bacterias Lácticas, Queso Tipo Paria, Condiciones Isotérmicas y No Isotérmicas.

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias lácticas son uno de los principales grupos de microorganismos responsables del sabor, aroma y textura del queso y los productos lácteos. En la actualidad la industria quesera en la Región de Puno se ha incrementado notablemente, pero existe un desconocimiento por parte de los productores en cuanto al manejo de los cultivos lácticos, a quien se le atribuye las características deseadas al queso. Uno de los principales factores que afectan la estabilidad bacteriana del queso tipo paria durante el almacenamiento y/o la maduración es la temperatura, ya que este factor no siempre se mantiene constante durante el almacenamiento, esta variación modifica la dinámica de crecimiento de las bacterias lácticas (cultivos lácticos), lo que trae como consecuencia la pérdida de la calidad física, química y sensorial, todo ello debido al incremento acelerado o desacelerado de la población de bacterias (curva de crecimiento de bacterias), que le confieren los atributos de olor, sabor, aroma y textura en el producto final, y cuyos parámetros específicos por cada tipo de queso es de gran interés, hoy en día determinarlos y manejarlos tecnológicamente a fin de cubrir las expectativas de mercado, con cuyo conocimiento es posible el control de la maduración del queso tipo paria, La microbiología predictiva es considerada una herramienta importante para cuantificar y predecir el comportamiento microbiano sobre la influencia de los diferentes factores ambientales, como por ejemplo, la temperatura, pH, o la composición de la atmosfera que no siempre se mantiene constante durante el almacenamiento de los alimentos. Debido a esto, en los últimos años, la microbiología predictiva está orientada para la predicción con modelos dinámicos, es decir, modelos que permitan predecir la seguridad y calidad de los alimentos sobre condiciones que varían con el tiempo, principalmente condiciones no isotérmicas.

Motivo por el cual es necesario ajustar modelos matemáticos de crecimiento de bacterias lácticas en el queso tipo paria en condiciones isotérmicas y no isotérmicas, en la presente investigación se ha considerado los siguientes objetivos:

- Obtener y comparar los parámetros de la curva de crecimiento de bacterias lácticas en queso tipo paria en condiciones isotérmicas de maduración mediante el ajuste de los modelos primarios.
- Determinar el modelo secundario que mejor se ajuste y describa la influencia de la temperatura sobre los parámetros de la curva de crecimiento de bacterias lácticas en queso tipo paria en condiciones isotérmicas de maduración a partir del ajuste de modelos primarios.
- Establecer un modelo predictivo que describa la curva de crecimiento de bacterias lácticas en condiciones no isotérmicas a partir de modelos primarios y secundarios obtenidos en condiciones isotérmicas de maduración.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 LECHE

La leche es un producto íntegro de secreción mamaria normal sin adición ni sustracción alguna, de vacas bien alimentadas, exenta de calostro y que ha sido obtenido mediante, la leche es el producto íntegro no adulterado, proveniente del ordeño higiénico regular, completo e ininterrumpido de vacas sanas, bien alimentadas sin calostro y exentas de color, sabor y consistencias anormales (Indecopi., 2004).

2.2 QUESO

El queso se define como un producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, donde la proporción entre las proteínas del suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido de dos formas: La primera, por coagulación total o parcial de leche y/o productos obtenidos de la leche por efecto del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación; la segunda, por técnicas de elaboración que comportan la coagulación de la leche y/o productos obtenidos de leche y que dan un producto final que posee características físicas, químicas y organolépticas similares al obtenido por el primer método (Covenin., 2000).

2.3 QUESO TIPO PARIÁ

Es un queso madurado de pasta semidura, de color amarillo, de textura firme, sin ojos, de corteza firme pero no dura, elaborado a base de leche entera de vaca, de oveja, o de una combinación de las dos. Normalmente tiene un periodo de maduración que oscila entre 7 y 21 días (Indecopi., 2004).

Los requisitos fisicoquímicos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Requisitos fisicoquímicos del queso tipo paria

| Tipo de queso | %grasa en extracto seco (mínimo) | % humedad (máximo) | % extracto seco (mínimo) |
|---------------|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Tipo paria | 45 | 48 | 52 |

Fuente: Indecopi., 2004.

2.4 BACTERIAS LÁCTICAS

Los cultivos lácticos (bacterias lácticas) tienen como función la fermentación de la lactosa con producción de ácido láctico como parte del proceso de maduración de los quesos (Bachmann y Spahr., 1995). También controlan a los microorganismos patógenos presentes en la leche pasteurizada al haber un tratamiento térmico insuficiente o por una contaminación post pasteurización, tal control ocurre a través del predominio de los cultivos lácticos sobre otros microorganismos, debido a la competencia por nutrientes (Gaya *et al.*, 1986).

2.4.1 CULTIVOS LÁCTICOS INICIADORES

En la actualidad se incluyen especies bacterianas de 12 géneros en un grupo designado como bacterias de ácido láctico debido a su capacidad para metabolizar cantidades relativamente grandes de ácidos lácticos a partir de carbohidratos (Ray y Brunia., 2010).

Entre los géneros se incluyen *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnebacterium*, *Weisella* y *Oenococcus*, muchos de estos géneros se crearon

recientemente a partir de géneros ya existentes e incluyen una o varias especies (Ray y Brunia., 2010).

2.4.2 LACTOCOCCUS

Los *Lactococcus* son los microorganismos mesolíticos más usados para la producción de ácido en las fermentaciones lácteas, pues son capaces de convertir rápidamente la lactosa en ácido láctico. Ellos tienen la capacidad de crecer a 10°C, mas no a 45 °C y en pH óptimo de 6,0-6,5, que son características importantes usadas en su identificación. En temperatura entre 20 °C y 30°C, los *lactococcus* llevan de 10 horas a 20 horas para fermentar la leche cruda. El número aproximado de células viables necesarias para realizar la coagulación acida de la leche es de 10⁶ufc/ml (Teuber., 1995).

Entre las especies conocidas de *Lactococcus*, solamente el *Lactococcus lactis*, es significativa en la fermentación de los productos lácteos, destacándose, como los más importantes, las subespecies *Lactococcus lactis subsp. Lactis* y *Lactococcus lactis subsp. Cremoris* (Fox *et al.*, 2000). A la vez, la variante *lactococcus lactis subsp. Biovar Diacetyláctis* es capaz de convertir citrato en diacetil, compuesto responsable por el sabor y aroma típicos de manteca en los quesos (Hassan y Frank., 2001). Las características que diferencian estas subespecies son representadas en la Tabla 2.

Los *Lactococcus* son generalmente predominantes en quesos frescos que no sufren cocimiento de masa. Su presencia es reducida durante el proceso de cura, pudiendo hasta desaparecer después de seis a ocho semanas (Fontan *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2000). También es interesante resaltar que Klin *et al.*, 1995 separaron *Lactococcus* de diferentes

fuentes ambientales como el suelo y agua de efluentes, indicando que estos microorganismos pueden sobrevivir fuera del ambiente de lácteos.

Tabla 2. Características que diferencian las dos subespecies de *Lactococcus lactis*

| Microorganismo | Metabolismo de citrato | Producción de NH ₃ de la arginina | Crecimiento en diferentes Temperaturas (°C) | | | | Concentración de NaCl |
|----------------------------------|------------------------|--|---|----|----|----|-----------------------|
| | | | 10 | 15 | 40 | 45 | |
| <i>Lc.láctis subsp. láctis</i> | ± | + | + | + | + | - | 4% |
| <i>Lc.láctis subsp. crémoris</i> | ± | - | + | + | - | - | 2% |

Fuente: Adaptada de Fox *et al.*, 2000.

2.5 MADURACION EN QUESOS

El queso madurado es el producto de la leche pasteurizada que después de su fabricación debe mantenerse durante cierto tiempo, en condiciones ambientales apropiadas, para que se produzcan los cambios bioquímicos y físicos característicos de este tipo de quesos. La maduración de los quesos se puede realizar con la adición o no de cultivos lácteos específicos (bacterias o mohos) (Indecopi., 2004).

La maduración de los quesos es una etapa fundamental del procesamiento, ya que ocurren cambios bioquímicos que dan origen a importantes características sensoriales en el producto, los que repercuten principalmente en los parámetros de consistencia, color, textura, sabor y olor (Alais., 1985).

La mayor parte de los quesos no se consumen en estado fresco, sino después de un periodo de maduración o afinado. Durante este tiempo se produce la transformación bioquímica, gradual y más o menos acusada, de los componentes del queso en muchos productos más solubles. En este proceso se desarrolla el aroma y tienen lugar diversas modificaciones físicas en la pasta, por ejemplo la textura se vuelve más untuosa, aparecen agujeros u ojos y se le forma la corteza superficial (Oria., 1996).

2.6 CRECIMIENTO BACTERIANO

Las bacterias lácticas o bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos Gram-positivos, catalasa negativos, no formadores de esporas y que generalmente crecen sobre condiciones microaerófilas o estrictamente anaeróbicas. (Klein *et al.*, 1998).

Las BAL pueden, aun ser clasificadas de acuerdo con la temperatura de crecimiento en mesofílicas y termofílicas. Las mesofílicas crecen a una temperatura optima de 30 °C y las termofílicas crecen a una temperatura optima de 42°C (Fox *et al.*, 2000).

En microbiología, la palabra “crecimiento” se define como un incremento en el número de células o de masa celular por unidad de tiempo de una población microbiana (Madigan *et al.*, 1997).

2.7 CURVA DE CRECIMIENTO

Es la representación gráfica del logaritmo del número de bacterias frente al tiempo, la curva teórica sería una recta, pues lo microorganismos estarían creciendo

constantemente, pero en la práctica, la curva presenta distintas fases, como se observa en la Figura 1.

En la Figura 1 se muestra cuatro fases del desarrollo bacteriano que se obtiene del número de células viables en función del tiempo en un cultivo discontinuo y asincrónico. Nótese la presencia de tres interfaces con variaciones de pendiente que indican la transición de una a otra fase del desarrollo: transición 1 entre las fases de latencia – exponencial, transición 2 entre las fases exponencial – estacionaria y la transición 3 entre las fases estacionaria – declive. En cultivos sincrónicos las interfaces tienden a desaparecer ya que las células crecen de forma simétrica y por tanto la curva de crecimiento adopta una forma lineal entre cada una de las cuatro fases de crecimiento (Cabeza., 2011).

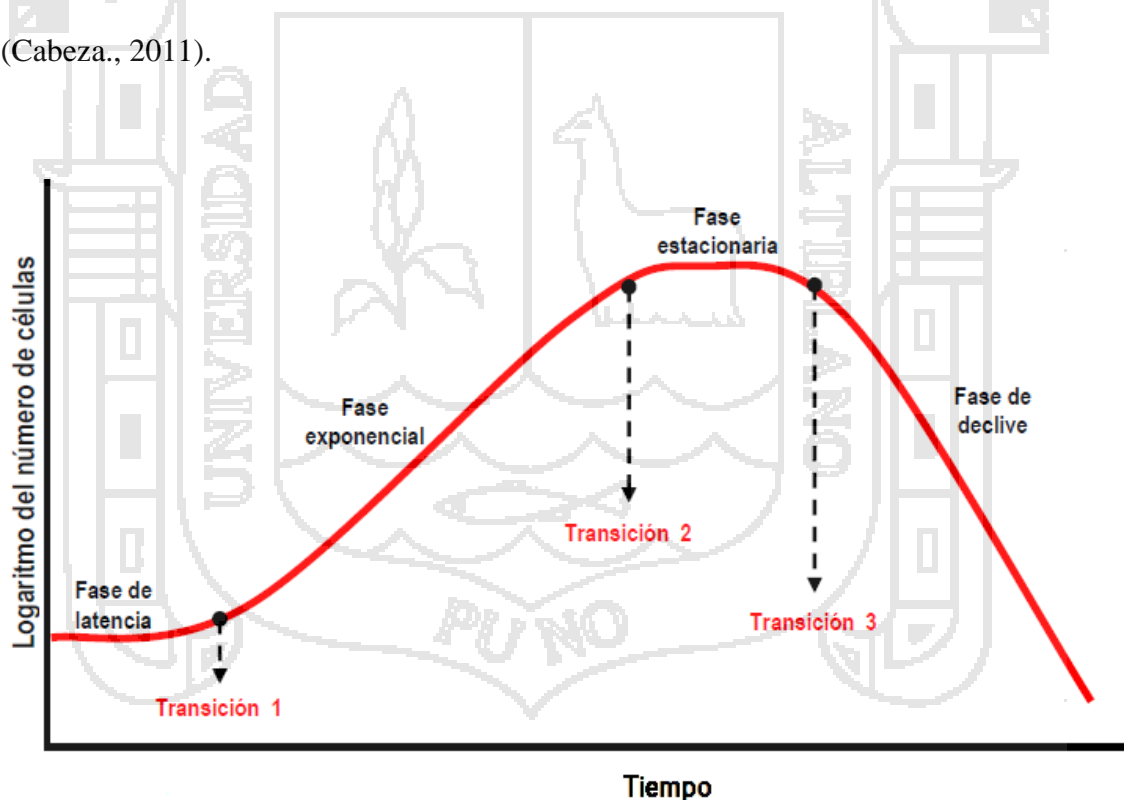


Figura 1. Curva de crecimiento Bacteriano

Fuente: adaptado de Cabeza., 2011.

2.7.1 FASES DE CRECIMIENTO MICROBIANO

La curva de crecimiento de un cultivo microbiano puede ser subdividida en cuatro partes distintas denominadas fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (Madigan *et al.*, 1997, Prescott *et al.*, 1999).

La fase de latencia o fase lag, es el período de ajuste que las células experimentan al ser transferidas de un medio al otro antes de iniciar su crecimiento. **La fase exponencial o logarítmica** es aquella durante la cual los microorganismos crecen y se dividen hasta el nivel máximo posible, en función de su potencial genético, tipo de medio y las condiciones en que crece. En este período hay una relación lineal entre el logaritmo del número de células (o cualquier otra propiedad medible de la población) y el tiempo. Los microorganismos se dividen y duplican en número en intervalos regulares. Como cada célula se divide en un momento ligeramente diferente del resto, la curva de crecimiento aumenta suavemente, en lugar de realizar discretos saltos. **La fase estacionaria** es resultado del agotamiento de los nutrientes disponibles o del efecto de acumulación de productos tóxicos de metabolismo que tienen como consecuencia la disminución de la velocidad del crecimiento. La transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria se caracteriza por un crecimiento desequilibrado, durante el cual los diversos componentes celulares son sintetizados a diferentes velocidades. **Y la fase de muerte** es consecuencia de diversos factores: uno importante es el agotamiento de las reservas celulares de energía. Al igual que el crecimiento, la muerte también asume una función exponencial que puede ser representada por una disminución lineal del número de las células viables a lo largo del tiempo (Madigan *et al.*, 1997, Prescott *et al.*, 1999).

2.8 PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

Los microbiólogos usan clásicamente tres parámetros para caracterizar una curva de crecimiento microbiano: tiempo de adaptación no fase lag (λ), la velocidad específica de crecimiento (μ) y la población máxima (N_{\max}), los parámetros estiman varios campos notables en la microbiología de alimentos (Baty *et al.*, 2004).

2.8.1 TIEMPO DE ADAPTACIÓN (λ)

Es un fenómeno inherente a la cinética microbiana, en la cual típicamente es observado como una respuesta tardía de la población microbiana al cambio de ambiente. La fase lag o tiempo de adaptación (λ) donde ocurre ambos procesos crecimiento e inactivación (Swinnen., 2005). Durante la fase de adaptación, los microorganismos pasan por cambios intracelulares, para adaptarse al nuevo ambiente (Yates y Smoter., 2007).

La fase de adaptación fue definida como el intervalo entre la inoculación del cultivo bacteriano y el tiempo del comienzo de su velocidad máxima de crecimiento y suele ser convencionalmente medido como el punto en el cuál la pendiente de la fase exponencial de crecimiento (en una gráfica semi-logarítmica) intercepta la línea horizontal trazada desde la concentración celular inicial, como refiere (Robinson *et al.*, 1998).

2.8.2 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO (μ)

La velocidad específica de crecimiento (μ) es un parámetro importante para modelar el crecimiento microbiano, pues evalúa la capacidad de crecimiento del microorganismo mostrando si hay dificultades o no (Perni *et al.*, 2005).

El crecimiento se define como un incremento en el número de células microbianas en una población, lo cual también puede ser medido como un incremento en masa

microbiana. En este contexto, la velocidad de crecimiento se define como el cambio en número de células o masa celular por unidad de tiempo (Madigan *et al.*, 1997).

La tasa del crecimiento exponencial se ve influenciada por las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio), así como por las características genéticas del microorganismo (Madigan *et al.*, 1997).

2.8.3 LA POBLACION MÁXIMA (N_{max})

Es un parámetro importante para los trabajos de cultivo mixto, pues esta puede sufrir reducciones significativas con relación al cultivo puro, tomándose en consideración factores ambientales como la temperatura y el nutriente presente en el medio de cultivo (Madigan *et al.*, 1997).

2.9 IMPORTANCIA DE LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO

La temperatura es el factor principal responsable por las reacciones bioquímicas de los alimentos, especialmente la deterioración microbiana, donde los parámetros cinéticos de crecimiento son altamente dependientes de la temperatura (Giannuzzi *et al.*, 1998; Labaide, 1999). Alimentos refrigerados son normalmente almacenados entre 0 y 10°C. A pesar de los microorganismos psicrófilos y psicrótroficos serán capaces de multiplicarse a temperaturas de refrigeración, las velocidades de multiplicación disminuyen en este rango de temperatura. La refrigeración también reduce las alteraciones químicas, físicas y bioquímicas de los alimentos y aumenta así la vida en anaquel del mismo. En tanto, la refrigeración solo vuelve esos procesos más lentos, no los elimina. Por tanto, es esencial que la cadena de frío sea controlada, caso contrario puede ocurrir el desenvolvimiento

microbiano rápido, disminuyendo la vida en anaquel del producto y ocurriría el riesgo de salud del consumidor (Massaguer., 2005).

2.10 CONDICIONES ISOTÉRMICAS

Son condiciones donde la temperatura se mantiene constante durante un determinado tiempo. Sin embargo, condiciones tales como la temperatura, pH o la composición de la atmosfera, entre otros no siempre se mantiene constante durante el almacenamiento. Por esto, en los últimos años está aumentando el interés por modelos dinámicos, es decir, modelos que permitan predecir el crecimiento de los microorganismos sobre condiciones que varían con el tiempo de almacenamiento del alimento, principalmente condiciones no isotérmicas (Mcmeekin *et al.*, 2006; Peleg., 2006).

2.11 MODELAMIENTO MATEMATICO Y MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA.

2.11.1 MICROBIOLOGIA PREDICTIVA

La Microbiología Predictiva en alimentos puede ser definida como una ciencia multidisciplinar y emergente de la microbiología de alimentos. Ella engloba disciplinas como matemática, microbiología, ingeniería y química para el desenvolvimiento y aplicación de modelos matemáticos que predigan la respuesta de microorganismos en condiciones ambientales específicas (McDonald y Sun., 1999).

Roberts y Jarvis (1994), definieron la microbiología predictiva como el estudio de la respuesta de crecimiento de microorganismos que crecen en los alimentos frente a factores que los afectan, y a partir de estos datos, predecir lo que sucederá en el almacenamiento. Los primeros trabajos acerca de este campo de la microbiología de

alimentos aparecieron durante la mitad de la década de los 80 (Farber., 1986; Baird *et al.*, 1987), comenzando a desarrollarse y perfeccionarse a partir de los años 90 (McMeekin *et al.*, 1988; Davey., 1992; Whiting., 1992).

2.11.2 MODELAMIENTO MATEMATICO

El termino modelo fue definido en diversas y excelentes revisiones de modelamiento matemático de procesos microbiológicos, el termino modelo matemático es más riguroso y se refiere a un conjunto básico de hipótesis en los procesos estudiados, algunos de ellos representados por medio de funciones y ecuaciones (diferenciales). Por lo tanto, desde un punto de vista mecanísticos, función y modelo no son términos equivalentes. Función es una abstracción matemática que hace más fácil la descripción de un modelo particular (Baranyi y Roberts, 1994).

Los modelos están generalmente basados en diversas hipótesis biológicas, en la interpretación de las diferentes fases de crecimiento microbiano, donde el principal objetivo esta direccionado para estudiar la fase de latencia cuya significancia biológica aun es pobre (Baty *et al.*, 2004).

2.11.3 CLASIFICACIÓN DE LOS MODELOS MATEMATICOS

Dentro de la microbiología predictiva una forma de clasificación de los modelos es en función de la utilización de determinadas funciones matemáticas. Más concretamente, un modelo predictivo puede ser cinético o probabilístico. La elección de un enfoque u otro, y su aplicación específica, está ampliamente determinada por el tipo de microorganismo que se estudia y el número de variables con las que se trabaja (Mcdonald y Sun., 1999).

2.11.4 MODELOS CINÉTICOS Y PROBABILÍSTICOS

2.11.4.1 *MODELO PROBABILISTICO*

Direccionado para el conocimiento de la condiciones en que un determinado evento pueda ocurrir (crecimiento y no crecimiento), describiendo la probabilidad en que estas condiciones puedan ser definidas (limites, combinaciones, temperaturas, aw, pH) (Nakashima *et al.*, 2000).

2.11.4.2 *MODELOS CINETICOS*

Corresponden al modelamiento de la extensión y velocidad de crecimiento o la destrucción de microorganismos de interés (Nakashima *et al.*, 2000).

Estos modelos podrían ser de tipo empírico (describen un conjunto de datos a través de una relación matemática conveniente) o el determinístico (suministra interpretación de los parámetros en términos de fenómenos y procesos conocidos) (McmeeKin *et al.*, 1993).

2.11.4.3 *MODELOS EMPÍRICOS Y MECANICISTAS*

Los modelos empíricos, como la función de Gompertz, son de interés en situaciones prácticas y simplemente describen los datos de crecimiento bajo condiciones experimentales en forma de una conveniente relación matemática (Gibson *et al.*, 1987). Otros ejemplos de este tipo de modelos son las redes neuronales artificiales, modelos de raíz cuadrada y sus modificaciones, así como las ecuaciones polinómicas (Geeraerd *et al.*, 1998). Estas últimas son fáciles de usar y no requieren el conocimiento particular de un proceso (Whiting., 1995). Sin embargo, estas ecuaciones no tienen fundamento teórico que avale un conocimiento biológico.

2.11.4.4 MODELOS PRIMARIOS, SECUNDARIOS Y TERCIARIOS

Fue Davey (1992), quien solicitó la creación de una terminología que expresase el significado de la descripción y desarrollo de la modelización predictiva. En respuesta a esta demanda, y para evitar las confusiones existentes. Whiting y Buchanan (1993), propusieron un nuevo sistema de clasificación para la microbiología predictiva, de acuerdo con criterios específicos, bajo tres niveles: modelos primarios, secundarios y terciarios.

2.11.4.5 MODELOS PRIMARIOS

Los modelos primarios los constituyen las expresiones matemáticas que describen el cambio del número de bacterias con el tiempo, bajo unas condiciones particulares del entorno y cultivo. La respuesta se puede medir directamente por recuento total, formación de toxina, nivel de substrato o productos del metabolismo, o bien indirectamente, por medida de densidad óptica o impedancia. Se puede generar información acerca de los parámetros de crecimiento microbianos, como el tiempo de generación, duración de la fase de adaptación, velocidad o tasa de crecimiento exponencial y densidad máxima de población (Whiting y Buchanan, 1993; Whiting, 1994).

a) MODELO DE GOMPERTZ O GOMPERTZ MODIFICADO

El modelo de Gompertz es una función exponencial doble, que describe una curva sigmoide asimétrica y está representado en la Ecuación 1 (Gibson *et al.*, 1987).

La base de este modelo es que, debido a la limitación de espacio y/o nutrientes, así como la producción de metabolitos tóxicos, la velocidad de crecimiento aumentaría hasta

un máximo y después disminuiría. De esta manera, la velocidad máxima de crecimiento exponencial es determinado en el punto de inflexión en la curva (Mckellar y Lu, 2004).

$$\text{Log}N = N_0 + A * \exp\{-\exp[-B(t - M)]\} \quad (1)$$

Donde Log N es el logaritmo decimal de la población bacteriana en el tiempo t, N_0 es el valor de la asíntota inferior (equivalente al Log de la población bacteriana inicial), A es el aumento de la densidad microbiana (equivalente al log del recuento microbiano máximo durante la fase estacionaria menos el Log del recuento inicial), B es la velocidad de crecimiento relativa en el tiempo M (h^{-1}) y M es el tiempo requerido para alcanzar la velocidad de crecimiento máxima (h). A partir de estos parámetros, la velocidad de crecimiento máxima (μ_{\max}) (h^{-1}) (Ecuación 2) y la duración de la fase Lag (λ) (h) (Ecuación 3) pueden ser calculados ($e=2,7182$).

$$\mu = \frac{A \cdot B}{e} \quad (2)$$

$$\lambda = M - \frac{1}{B} \quad (3)$$

El modelo de Gompertz fue reparametrizado por Zwietering *et al.*, (1991) (Ecuación 4), con el objetivo de obtener una representación directa de los parámetros de interés biológico λ y μ , resultando el modelo de Gompertz modificado. Por ser una reparametrización, los dos modelos presentan ajustes similares.

$$\text{Log}(N) = N_0 + A \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu \cdot e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (4)$$

Este modelo es bastante utilizado para describir el comportamiento microbiano en

diferentes medios de cultivo y alimentos (Juneja y Marks., 1999; Nakashima *et al.*, 2000; Cayré *et al.*, 2003; Slongo *et al.*, 2009).

b) MODELO LOGISTICO

La diferencia entre el modelo logístico y el modelo de Gompertz es que, en el primero, la curva logística es descrita por una curva sigmoide simétrica (Gibson *et al.*, 1987). Este modelo es representado por la Ecuación 5.

$$\log(N) = N_0 + \frac{A}{\{1+\exp[-B.(t-M)]\}} \quad (5)$$

Donde los parámetros del modelo representan los mismos significados de la Ecuación 1. Siendo el parámetro μ dado por la Ecuación 6 y el parámetro λ por la Ecuación 7.

$$\mu = \frac{A.B}{4} \quad (6)$$

$$\lambda = \frac{M-2}{B} \quad (7)$$

La aplicación del modelo logístico es más limitada cuando comparada con el modelo de Gompertz. Este modelo ha sido utilizado, por ejemplo, en el ajuste de curvas de crecimiento de microorganismos deteriorantes en peces (Dalgaard *et al.*, 1997; Koutsoumanis y Nychas, 2000), además de haber sido utilizado en la evaluación de la significancia del tamaño de inóculo en la fase de Latencia o de adaptación de *Listeria monocytogenes* (Augustin y Carlier., 2000).

c) MODELO LOGÍSTICO MODIFICADO

Para corregir una falla del modelo logístico, donde el ajuste del modelo, en muchos casos, no parte del punto de origen, una nueva versión fue propuesta por Corradini y Peleg., (2005), llamada de logístico modificado (Ecuación 8).

$$\log(N) = N_0 + \frac{A}{1+\exp[-B*(t-M)]} - \frac{A}{1+\exp(B*M)} \quad (8)$$

$$\mu = \frac{A \cdot B}{4} \quad \lambda = \frac{M - 2}{B}$$

A, B y M están representados en la Ecuación 1, respectivamente. El segundo término del lado derecho de la Ecuación fue introducido para satisfacer la condición de que el inicio de la curva de crecimiento sea a partir del punto de origen, es decir, cuando $t=0$, $\log(N/N_0)=0$, y cuando $t \rightarrow \infty$, $\log(N/N_0) \rightarrow \text{constante}$.

d) MODELO DE BARANYI Y ROBERTS

Baranyi y Roberts (1994) establecieron un modelo para entregar una base de datos más mecanista o biológica (Ecuación 9), incluyendo una fase de crecimiento exponencial lineal y una fase lag que se calcula mediante una función de ajuste (Ecuación 9). Un importante concepto presentado por este modelo es que la fase lag observada es una combinación del estado fisiológico de las células y de la adaptación al nuevo ambiente. Si las células no están preparadas para crecer o la adaptación es lenta, la fase lag será extendida. Una vez que las células se adapten al nuevo ambiente. Ellas crecerán exponencialmente hasta alcanzar la fase estacionaria, limitaciones dadas por el medio de crecimiento (Baranyi y Roberts, 1994; Mckellar y Lu, 2004).

$$\log(N) = N_{max} + \ln\left(\frac{(-1+\exp(B*\lambda)+\exp(B*t))}{(-1+\exp(B*t)+\exp(B*\lambda+A))}\right) \quad (9)$$

2.11.4.6 *MODELOS SECUNDARIOS*

Los modelos secundarios están compuestos por ecuaciones que describen cómo varían los parámetros de crecimiento de los modelos primarios (tasa de crecimiento, duración fase de adaptación, aumento logarítmico, etc.) con cambios en uno o más factores ambientales (temperatura, pH, a_w , atmósfera gaseosa, etc.). Ejemplos de estas ecuaciones son las basadas en las fórmulas de Arrhenius o en la de la Raíz Cuadrada (McMeekin *et al.*, 1993; Skinner *et al.*, 1994), particularmente si la temperatura es el principal factor de control del crecimiento, aunque dichos modelos ya han sido ampliados para incluir el pH y la a_w .

Las aproximaciones actuales a la MPA (microbiología predictiva de alimentos) han intentado comprender y establecer una conexión entre el crecimiento de los microorganismos y los factores de control del crecimiento, tales como la temperatura. Por ello, la gran mayoría de modelos secundarios están basados en aproximaciones cinéticas (Labuza y Fu., 1993), siendo los más utilizados los modelos de Arrhenius y Arrhenius modificado, y los modelos polinómicos y de raíz cuadrada.

Los factores ambientales que afectan al crecimiento pueden ser fijados en un alimento en particular. De entre todos ellos, la temperatura es considerada normalmente como el más importante, la cual afecta en gran medida a la velocidad de crecimiento. Este efecto se observa en alimentos tales como la carne o leche, los cuales poseen valores de a_w y pH cercanos a la neutralidad. Sin embargo, en la mayoría de los productos, la temperatura es sólo uno de la serie de factores que afectan la velocidad de crecimiento microbiano.

Los modelos secundarios más utilizados en la literatura son el modelo de la raíz cuadrada, también conocido como Bélerádek, y la Ecuación de Arrhenius, que son los dos principales modelos secundarios que han sido propuestos para describir el efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano (Ratkowsky *et al.*, 1982; Mcmeekin y Ross, 1996; Cayré *et al.*, 2003; Mataragas *et al.*, 2006). El modelo de la raíz cuadrada está dado por la Ecuación 10 y la Ecuación de Arrhenius por la Ecuación 11.

$$\sqrt{k}=b(T - T_{\min}) \quad (10)$$

Donde k es el parámetro de interés del modelo, b representa el coeficiente de regresión, T es la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y T_{\min} es la temperatura mínima para el crecimiento o coeficiente del modelo.

$$k = A.\exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad (11)$$

Donde k es la velocidad de crecimiento, A es la constante de la Ecuación (factor pre-exponencial), T es la temperatura (K), E_a es la energía de activación para el crecimiento microbiano (kJ/mol) y R representa la constante universal de los gases (8.314 J/K.mol) (McDonald y Sun., 1999).

La clásica Ecuación de Arrhenius, en algunos casos, no describe bien el efecto de la temperatura en las velocidades de crecimiento de los microorganismos. Por este hecho, varios modelos secundarios están basados en la Ecuación de Arrhenius, realizando modificaciones mecánísticas y/o empíricas en la Ecuación original (Koutsoumanis y Nychas., 2000; Phua y Davey., 2007; Bahadori y Vuthaluru., 2010).

La Ecuación del tipo de Arrhenius está dada por la Ecuación 12 (Gil *et al.*, 2006).

$$\ln k = a \left(\frac{1}{T} \right) + b \quad (12)$$

Donde k es el parámetro de interés del modelo, a y b son coeficientes del modelo y T es la temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

Además de estos dos modelos, la influencia de los factores ambientales sobre los parámetros de crecimiento puede ser descrita a través de ecuaciones lineales, exponenciales, polinomiales o superficie de respuesta, redes neuronales, conforme el mejor ajuste a los datos propuestos (Corradini y Peleg., 2005).

2.11.4.7 MODELOS NO ISOTÉRMICOS

Los modelos matemáticos son usados para cuantificar y predecir el comportamiento microbiano sobre diferentes condiciones ambientales, y muchos de estos modelos son basados en datos experimentales a condiciones constantes. Sin embargo, condiciones tales como la temperatura, pH o la composición de la atmosfera, entre otros no siempre se mantiene constante durante el almacenamiento. Por esto, en los últimos años está aumentando el interés por modelos dinámicos, es decir, modelos que permitan predecir el crecimiento de los microorganismos sobre condiciones que varían con el tiempo de almacenamiento, principalmente condiciones no isotérmicas (Mcmeekin *et al.*, 2006; Peleg., 2006).

Para que los modelos matemáticos puedan ser aplicables a alimentos almacenados en condiciones reales, es necesario considerar, dentro del modelo, el efecto

de los cambios de temperatura de almacenamiento sobre el crecimiento microbiano, con el fin de obtener predicciones más precisas en relación a la inocuidad y vida en anaquel de los mismos (Cayré *et al.*, 2004). Para el establecimiento de un modelo no isotérmico, algunas consideraciones son definidas de acuerdo a cada estudio, dependiendo al microorganismo y del ambiente de crecimiento. En la bibliografía, algunos modelos no isotérmicos son propuestos, entre ellos el modelo de Corradini y Peleg., (2005) y el modelo de Van Impe *et al.*, (1992).

Según Corradini y Peleg (2005), la base del desenvolvimiento de un modelo de crecimiento no isotérmico está dada dos etapas principales. La primera etapa consiste en generar datos de crecimiento microbiano en diferentes temperaturas constantes, ajustando un modelo primario a los datos para la obtención de los parámetros de crecimiento. En seguida, la influencia de la temperatura en estos parámetros es descrita por los modelos secundarios. Para estimar el crecimiento microbiano sobre condiciones de variación de temperatura, la forma diferencial del modelo primario debe ser usada, como la inclusión de los modelos secundarios.

En el modelo desarrollado por estos autores, se asume que, la velocidad de crecimiento no isotérmica momentánea es la velocidad isotérmica a la temperatura momentánea, a un determinado tiempo que corresponde el nivel de crecimiento momentánea de la población. De nuevo, la velocidad de crecimiento momentánea en condiciones no isotérmicas depende no solo del cambio de la temperatura, también del cambio del estado fisiológico de la población en crecimiento (Corradini *et al.*, 2006; Peleg, 2006).

El modelo de crecimiento de Corradini y Peleg fue propuesto a partir de dos modelos primarios, siendo el primero una Ecuación empírica simple y el segundo el modelo logístico modificado (Ecuación 8, donde $\text{Log}(N/N_0)=y(t)$). La derivada en relación al tiempo del modelo logístico modificado está representada por la Ecuación 13.

$$\frac{dy(x)}{dt (t_{cte})} = \frac{k(T)a(T)\exp[k(T)(t_c(T)-t)]}{[1+\exp(k(T)(t_c(T)-t))]^2} \quad (13)$$

Donde los parámetros del modelo son $a(T)$ que es la población máxima alcanzada, $k(T)$ está relacionado al crecimiento en la fase exponencial (h^{-1}) y $t_c(T)$ es el punto de inclinación en la curva (h).

La influencia de la temperatura en los parámetros de crecimiento puede ser representada por ecuaciones empíricas, considerando que la temperatura varía con el tiempo $[T(t)]$:

$$a(T) = a(T(t)): \quad (14)$$

$$k(T) = k(T(t)): \quad (15)$$

$$t_c(T) = t_c[T(t)]: \quad (16)$$

Con la inclusión de estos parámetros representados por las ecuaciones 14, 15 y 16 en la derivada con relación al tiempo de la Ecuación del modelo logístico modificado (Ecuación 13), se puede obtener la Ecuación 17, que representa el modelo de crecimiento no isotérmico.

$$\frac{dy(t)}{dt} = \frac{k(T(t))a[T(t)]\exp[k(T(t))(t_c(T(t))-t^*)]}{[1+\exp(k(T(t))(t_c(T(t))-t^*))]^2} \quad (17)$$

Donde t^* está definido por la Ecuación 18 y representa el tiempo que corresponde a cualquier nivel de crecimiento isotérmico, y está dado por el inverso de la Ecuación 8.

$$t^* = \frac{1}{k(T)} \log_e \left[\frac{\exp[k(T)t_c(T)](a(T)+y(t)\{1+\exp[k(T)t_c(T)\}])}{a(T)\exp[k(T)t_c(T)] - y(t)\{1+\exp[k(T)t_c(T)\}]} \right] \quad (18)$$

El modelo fue aplicado a los datos de crecimiento isotérmico y no isotérmico de *Pseudomonas spp.* En pescado refrigerado (0°C a 8 °C) (Koutsoumanis y Nychas., 2000) y *Escherichia coli* en caldo nutriente (27,6 °C a 36 °C) (Fujikawa *et al.*, 2004). Según los autores el procedimiento puede ser utilizado para generar las curvas de crecimiento sobre historias térmicas complicadas que pueden incluir oscilaciones de temperaturas, viendo que las curvas de crecimiento predictas estaban coherentes con los datos experimentales obtenidos.

Otro modelo no isotérmico propuesto en la literatura es el modelo de Van Impe *et al.*, (1992) según el estudio realizado por Zwietering *et al.*, (1990 y 1991) el modelo de Gompertz fue usado para ajustar los datos de crecimiento de *L. plantarum*, cultivada en MRS a diferentes temperaturas isotérmicas (6°C a 43°C) ya que la influencia de la temperatura fue mejor descrita por el modelo de la raíz cuadrada modificado, para los parámetros μ y A y por un modelo hiperbólico para el parámetro λ . Con base en estos modelos, Van Impe *et al.*, (1992) establecieron un modelo no isotérmico en dos etapas. Primeramente fue realizado un modelo no isotérmico solamente para el crecimiento microbiano. En una segunda etapa fue incluida la inactivación y la posible transición del crecimiento hasta la inactivación. Van Impe *et al.*, (1995) describen un enfoque más general para definir este modelo no isotérmico de crecimiento e inactivación.

Smith-Simpson *et al.*, (2007) simularon el crecimiento de *Clostridium perfringens* en carne molida sobre condiciones no isotérmicas a partir del modelo de Corradini y Peleg., (2005). Los autores ajustaron ecuaciones exponenciales para describir la influencia de la temperatura en la velocidad de crecimiento y en la fase Lag. La población máxima microbiana fue considerada constante. La simulación fue validada con los datos experimentales no isotérmicos.

2.12 ANALISIS DE DATOS PARA MODELAMIENTO MATEMATICO

2.12.1 DESARROLLO, COLECCIÓN DE DATOS Y VALIDACIÓN DE LOS MODELOS

El desarrollo de un modelo predictivo en el ámbito de la microbiología de los alimentos está básicamente fundamentado en cuatro pasos: diseño y planteamiento, colección de datos y análisis, ajuste de los datos y validación de los modelos (Mcmeekin *et al.*, 1993).

2.12.2 DISEÑO Y PLANTEAMIENTO DE LOS MODELOS

En el desarrollo de un modelo predictivo es esencial conocer las necesidades de aplicación del modelo. Los experimentos se deben diseñar de tal manera que se haga el mejor uso tanto del tiempo como de los recursos. Los requerimientos de los modelos pueden depender de si el usuario necesita conocer los efectos de las variables en los microorganismos o los límites más altos o más bajos para la conservación o crecimiento. La variabilidad inherente que nos encontramos al trabajar tanto con los microorganismos como con carnes y productos cárnicos indica que los experimentos se deben diseñar para encuadrar esta variabilidad tanto como sea posible (Mcmeekin *et al.*, 1993).

Una estrategia general propuesta para el diseño experimental de los modelos predictivos de crecimiento realizada por Davies (1993) incluye los siguientes pasos:

- Definir el objetivo experimental.
- Enumerar todas las variables y determinar aquellas más importantes.
- Determinar el rango de fluctuación de estas variables.
- Seleccionar el medio o sustrato más adecuado.
- Establecer las características del inoculo a utilizar (estado fisiológico, tamaño inicial, una única cepa o una mezcla, forma de inoculación, etc.).
- Determinar la posible influencia o competencia con otros microorganismos con la flora alterante autóctona del alimento.

La realización de experimentos preliminares es de gran importancia para conseguir los objetivos planteados con una menor inversión de tiempo y esfuerzo. La reducción del número de variables independientes incorporadas al modelo, por ejemplo, puede reducir significativamente el trabajo y costes de material. Modelos predictivos son verdaderamente difíciles de desarrollar cuando son incluidas más de cuatro variables independientes. Esto hace necesario determinar el nivel de relevancia de los parámetros intrínsecos y extrínsecos para un alimento específico y así desarrollar el modelo predictivo basado en este conocimiento (Devlieghere *et al.*, 2001).

La mayoría de los modelos de crecimiento utilizan como inoculo cultivos crecidos durante 18-24 horas en condiciones óptimas. Así, la fase de latencia representa el tiempo de adaptación del inoculo, desde las últimas etapas de la fase logarítmica o primeras de la fase estacionaria, a las nuevas condiciones ambientales, probablemente menos favorables. La duración de la fase de latencia depende de la temperatura previa de

incubación, así como de las nuevas condiciones de crecimiento (Hudson., 1993). Las células adaptadas a las altas temperaturas, y transferidas después a bajas temperaturas, tienen los períodos de latencia más prolongados. Los períodos de latencia mínimos a cada temperatura se producen con inóculos pre-adaptados a la misma temperatura. Una vez las células se han adaptado, las temperaturas previas no tienen efecto sobre la tasa de crecimiento. Probablemente se encontrarían efectos similares para el pH y otros cambios ambientales (Devlieghere *et al.*, 2001).

2.12.2.1 ACUMULACIÓN DE DATOS

Para la elaboración de un modelo predictivo seguro se requiere una gran cantidad de datos, que se deben recoger a lo largo de la totalidad de la curva de crecimiento, por lo que se pueden emplear varios meses de trabajo para llevar a cabo experimentos con múltiples variables de crecimiento. Desde un punto de vista estadístico, los parámetros cinéticos de crecimiento (fase de adaptación, tasa de crecimiento, aumento logarítmico de población) se obtienen con una buena precisión cuando se replican un número suficiente de veces las curvas de crecimiento y cuando cada réplica contiene un gran número de puntos experimentales que la describen (Begot *et al.*, 1996).

Los métodos de acumulación de datos son variados, pero el método estándar es el recuento en placa, ampliamente utilizado desde los comienzos de la microbiología. Este método es el preferido para la enumeración de células, a pesar de la posible subestimación por la presencia de agregados de microorganismos en forma de cadenas o grupos. El problema se minimiza mediante el uso de frascos en agitación, y un simple examen microscópico puede determinar si se necesitan técnicas más enérgicas. Una de las ventajas del recuento en placa es que el límite inferior de detecciones tan bajo como 20 ufc/ml. El

muestreo repetido del mismo frasco produce curvas más precisas que el muestreo de diferentes frascos para cada tiempo, pero incrementa la posibilidad de contaminación. Otra de las ventajas del recuento en placa es que determina sólo células viables y que puede ser usado para realizar recuentos microbianos tanto en alimentos como en medios líquidos de laboratorio (McMeekin *et al.*, 1993).

2.12.2.2 AJUSTE DE LOS DATOS

Una vez obtenidos los datos de crecimiento microbiano por cualquiera de las técnicas anteriormente descritas (recuento en placa, conductividad, turbidimetría, etc.), estos datos son ajustados a alguno de los modelos primarios existentes, de forma que se expresa la evolución de la densidad celular en función del tiempo. Así se obtienen los parámetros de crecimiento (tasa máxima específica de crecimiento, fase de adaptación, tiempo de generación, densidad máxima de población, etc.) para cada combinación de factores ambientales. En una segunda fase, los modelos secundarios son aplicados para predecir cómo varían dichos parámetros de crecimiento en función de los cambios en uno o más factores ambientales, extrínsecos o intrínsecos (McMeekin *et al.*, 1993).

2.13 COMPARACIÓN MATEMÁTICA

Se pueden usar varios índices matemáticos para evaluar la fiabilidad o bondad de ajuste de los modelos predictivos de crecimiento. Estos se describen a continuación (Adair *et al.*, 1989; Sutherland *et al.*, 1994).

El estadístico Raíz del error cuadrático medio (RMSE, Root Mean Square Error), raíz del sumatorio de los residuos al cuadrado dividido por el número de grados de libertad (n), es una medida de variabilidad residual, la cual no es explicada por los cambios

deliberados en factores como la temperatura, pH y a_w . El número de grados de libertad es igual al número de datos o valores. Esta variabilidad residual puede venir causada por varios motivos incluyendo la variabilidad natural y errores sistemáticos. El valor más bajo de RMSE significa la mejor idoneidad del modelo predictivo para describir los datos (Adair *et al.*, 1989; Sutherland *et al.*, 1994).

El MSE y la RMSE son utilizados para medir la dispersión de los errores, con el fin de medir la precisión del pronóstico, es decir, que tanto se acercan o se alejan los valores de pronóstico de los valores reales. Si los valores de MSE o la RMSE son pequeños, significa que los valores del pronóstico son muy aproximados a los valores reales, valores grandes significan que existen grandes errores en el pronóstico (Adair *et al.*, 1989; Sutherland *et al.*, 1994).

2.13.1 COEFICIENTE DE REGRESIÓN MÚLTIPLE

El coeficiente de regresión múltiple (R^2) es utilizado con frecuencia como una medida del ajuste total conseguido. Este coeficiente mide la fracción de la variación, alrededor de la media, que es explicada por el modelo. El valor más cercano a 1 significa una mejor predicción obtenida por ese modelo (Grau y Vanderline, 1993; Duffy *et al.*, 1994; Sutherland *et al.*, 1994).

2.13.2 INDICES MSE Y RMSE

El MSE y RMSE son utilizados para medir la dispersión de los errores, con el fin de medir la precisión del pronóstico, es decir, que tanto se acercan o se alejan los valores del pronóstico de los valores reales. Si los valores del MSE o RMSE son pequeños,

significa que los valores del pronóstico son muy aproximados a los valores reales, valores grandes significan que existen grandes errores en el pronóstico (Sutherland *et al.*, 1994).

2.13.3 INDICES SESGO Y EXACTITUD

Proporcionan una indicación objetiva de la idoneidad o buen funcionamiento de un modelo (Ross, 1996). En contraposición a los métodos estadísticos tradicionales, estos índices no están basados en la desviación existente entre la respuesta observada y la media. Este hecho causa un problema a la hora de evaluar la fiabilidad de los modelos con nuevos datos, puesto que la principal respuesta es desconocida. Está bien documentado que estos factores son herramientas útiles para medir la fiabilidad de los modelos predictivos (Neumeyer *et al.*, 1997; Dalgaard y Jorgensen., 1998).

A. **Bias o factor sesgo (Bf):**

Este factor responde a una medida de la desviación estructural de un modelo. Dónde: Un factor sesgo > 1 Indica un modelo seguro para el caso de la tasa específica de crecimiento cuyo valor observado es inferior al estimado por el modelo predictivo, en este sentido el modelo proporciona un margen de seguridad (Ross, 1996). En cambio un valor un factor sesgo < 1 para la fase de adaptación proporcionado por un modelo significa que la predicción estimada es segura, puesto que la fase de adaptación observada es mayor que la predictiva. El factor sesgo no proporciona información del promedio de la exactitud de las estimaciones, puesto que la sobre o subestimación tiende a cancelarla. Por lo tanto se debe calcular el factor de exactitud (Ross., 1996).

B. **Accuracy o Factor Exactitud (Af):**

El valor mayor alcanzado por el Af significa menos exactitud en la estimación. Un

valor de A_f de 1,7 indica que las predicciones, en promedio, difieren un 70% de las observaciones. Si no hay desviación estructural ($\text{sesgo}=1$, ambas desviación es positiva y negativa en promedio, el modelo es exacto), la falta de exactitud pueden ser mostrada por el A_f (Ross., 1996).

Cuando ambos índices toman el valor de la unidad significa que existe concordancia perfecta entre los valores de los parámetros decrecimiento predictivos y los observados. Cuando las predicciones difieren de los valores observados, la diferencia puede ser debida a factores no incluidos en el modelo, como por ejemplo, nitrito, dióxido de carbono presente en la atmósfera que rodea al alimento, etc. Si en cambio la respuesta observada difiere sustancialmente de la predicción es importante determinar la razón de esta diferencia. Algunos alimentos contienen sustancias naturales antimicrobianas, como sucede en los huevos. En otros casos la estructura del alimento juega un papel determinante, quizás porque limite la difusión de substrato su oxígeno al microorganismo, o por producción de compuestos ácidos (Robins *et al.*, 1994).

3. MATERIALES Y MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

En la Escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional del Altiplano, situado en la provincia y departamento de Puno ubicado sobre 3827 msnm.

3.2 MATERIAL EXPERIMENTAL

3.2.1 Materia prima

Leche entera (Leche de vaca fresca, procedente del INIA-ILLPA-PUNO)

3.2.2 Insumos

- Cuajo (quimosina) 1% “CHR-HANSEN”
- Cultivo láctico (CHR-HANSEN CODIGO R-707)
- Cloruro de calcio
- Cloruro de sodio

3.2.3 Utensilios

- Cuchillos, Jarras, bandejas, moldes y envases plásticos
- Ollas de aluminio, Tela, Lira, y Cepillo para quesería
- Cocina semi-industrial

3.2.4 Materiales de laboratorio

- Papel de aluminio
- Vaso precipitado
- Gradilla esterilizable sin alambre No-Wire
- Pipeta marca pírex de 10 ml y 1ml.
- Tubos de ensayo
- Matraces Erlenmeyer, boca angosta graduado de 100, 250 y 500 ml marca pírex

- Placas de Petri 15 ml
- Cucharas, espátulas y cuchillos
- Jeringas descartables de 1ml
- Mechero bunsen

3.2.5 Reactivos

- Hidróxido de sodio (NaOH 0,1N)
- fenolftaleína al 1%
- Alcohol puro 96°

3.2.6 Medios de cultivo

- Agar M17 Broth acc. To TERAGHI
- Agua de peptona
- Lactosa (para el uso con AGAR M17)
- Agua destilada

3.2.7 Equipos

- Balanza analítica precisión marca AND FR -300 Japón Cap. De 0.0001 a 310 gr.
- pH-metro digital modelo HM – 5S.
- Termómetro 5 ~ 120°C marca Pirex.
- Refrigeradora marca LG
- Estufa labor Muszeripari Muvek
- Autoclave P- selecta Autotester 437 G.
- Contador de colonias tipo keebec
- Lactodensímetro de Quevenne
- Mesa de acero inoxidable y Prensa mecánica.

3.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.3.1 DIAGRAMA EXPERIMENTAL

En la Figura 2, se observa el diagrama experimental para la presente investigación.

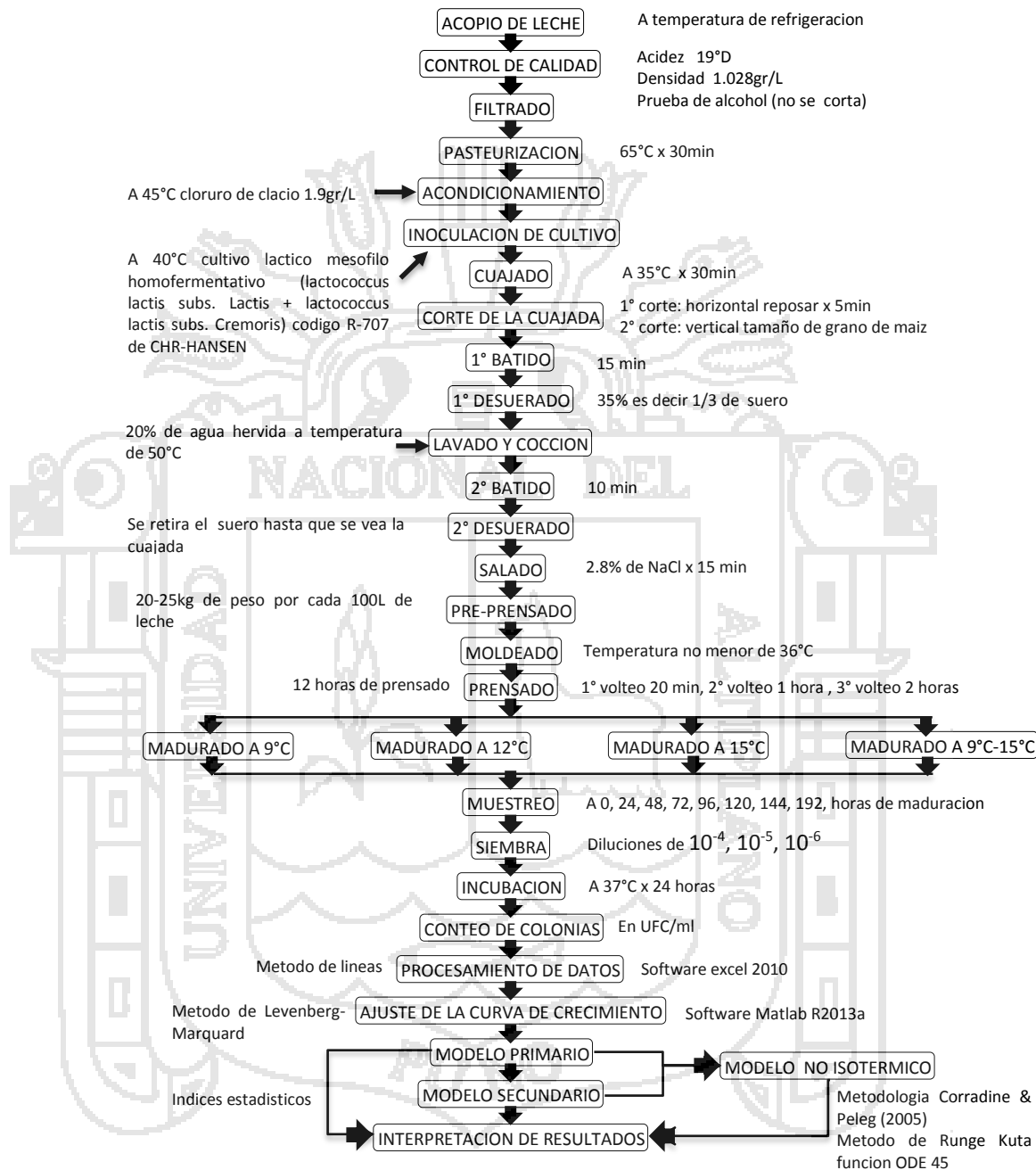


Figura 2. Diagrama experimental

Fuente: Elaboración propia

3.3.2 PROCEDIMIENTO DEL DIAGRAMA EXPERIMENTAL

a. Acopio de la leche

Se realizó el control de calidad de la leche con la determinación de acidez, la densidad y la prueba del alcohol, y también la prueba para ver si no contenía antibióticos. Y su posterior filtrado antes de proceder a elaborar.

b. Control de calidad

Una vez obtenida la leche para procesamiento se realizó de inmediato el control de calidad realizando el análisis de acidez (19°D), densidad (1.028gr/L) y la prueba de alcohol cuyo resultado fue negativo (no se corta la leche).

c. Pasteurización

Esta operación se realizó a una temperatura de 65°C por 30 minutos. Con este proceso evitamos microorganismos contaminantes, pues este proceso evita que los microorganismos proliferen.

d. Acondicionamiento

La leche se acondicionará hasta 45°C, para agregar el cloruro de calcio (1,9 g por 10 litros), a fin de evitar la precipitación de proteínas, Esta adición se realizó para evitar que el calcio se adhiera a las paredes del recipiente, habiendo una pérdida de este elemento. Si no se restituye el calcio perdido, la cuajada puede resultar un poco débil, afectando la calidad textural del producto final.

e. Adición de fermento láctico (inoculación)

El cultivo láctico usado para nuestro producto es de la marca CHR-HANSEN con código R-707 (mesófilo homofermentativo) de la cepas *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. cremoris*. Para la adición del fermento láctico la leche debe estar a temperatura de 38-40°C y una acidez de 20°D, Se agregó 50ml de cultivo por cada 24 litros de leche.

f. Adición de Cuajo

Se preparó una solución de sal al 2,5% para añadir el cuajo. Se esperó que se disuelva y luego se echó a la leche a 38°C de temperatura. Se Agito constantemente a fin de distribuir el cuajo en toda la leche. La coagulación fue de 30 minutos a una temperatura de 36 °C.

g. Primer Corte

Es la división del coágulo de caseína, con ayuda de un cuchillo para este primer corte la cuajada se dividió en 8 a 10 partes, seguidamente se dejó en reposo por 5 minutos.

h. Segundo Corte

Una vez cumplido los 5 min, se pasó a hacer un segundo corte. En esta etapa hay que cortar el coágulo hasta llegar a trozos del tamaño de un maíz. El tamaño de los granos de cuajada depende del contenido de agua que se desea en el queso. El queso “tipo paria” es un queso semiduro (de bajo contenido de humedad) por lo que los granos deben ser pequeños.

i. Primer batido

Se agitó suavemente los granos de cuajada para favorecer la salida del suero que poseen en su interior. Se agito la cuajada con una paleta de madera, con movimientos muy suaves y circulares en forma de ocho. Este batido se hace por un lapso de 15 min, dejando reposar al término por otros 5 min.

j. Primer desuerado

Se retiró parte del suero obtenido en consecuencia del corte y el batido. Se eliminó 4 litros de suero por cada 10 litros de leche o en todo caso el 35-40% de suero. Es la etapa en la que se debe eliminar el suero por escurrido.

k. Cocción y lavado

Una vez escurrido el suero se agregó agua a la masa cuajada de leche, y a fin de darle buena apariencia hay que someterla a lavado, con agua caliente para ayudar a sacar todo el suero. El agua utilizada fue a una temperatura de 50°C.

l. Segundo batido

Se procedió a batir por. 10 minutos, de acuerdo a la maduración del grano con el fin de facilitar el lavado. Este batido termina cuando la cuajada presenta facilidad para el moldeado.

m. Segundo Desuerado

Se procede a eliminar todo el suero restante, hasta que se vean los granos de la cuajada.

n. Salado

El salado se realizó de manera directa en la olla. Se agregó el 2.8% en un 5% de agua de acuerdo a la cantidad de leche. Primero se diluyó la sal en agua y luego se pasteurizó a 85°C por 5 minutos y se atemperó a 38°C. Luego se dejó reposar por 20 minutos.

o. Pre-prensado.

Se realizó con la finalidad de poder lograr un buen desuerado, para lo cual se utilizó la proporción de 20 kg. De peso por 100L de leche, el tiempo de pre-prensado fue de 20 minutos, la ventaja de realizar este proceso es que vamos a tener un queso con muy pocos o casi nada de ojos mecánicos y nos facilita el moldeo.

p. Moldeo

En los moldes de queso se colocaron las correspondientes telas queseras. Una vez los moldes listos, se cogió una porción de masa para echar a cada molde.

q. Prensado

En esta etapa se siguió eliminado suero, se compacta la cuajada para darle la forma definitiva al queso, el tiempo de prensado fue de 10 horas. En nuestro caso se hizo tres volteos de la forma siguiente: primer volteo se realizó a los 20 minutos, el segundo volteo a una hora después y el tercer volteo se hizo a las dos horas.

r. Maduración

La maduración del queso se realizó por 2 semanas aprox. Hasta conseguir que los recuentos de bacterias lleguen a su nivel máximo. Par esto se acondicionó cámaras de maduración a temperaturas de 9, 12, 15°C y una cámara acondicionada con temperatura de variación de 9-15°C.

s. Muestreo

En esta etapa de la investigación se sacó 10 gr. de muestra de cada tratamiento para hacer la siembras necesarias en cada etapa de muestreo (0 hasta 192 horas).

t. Siembra

En esta operación se realizó las diluciones sucesivas. Se sembraron por duplicado las diluciones 10-4, 10-5 y 10-6.

u. Incubación

Se incubo las bacterias en las estufas o cámaras incubadoras calibradas a temperaturas de 37°C para el desarrollo y crecimiento de las bacterias, se colocaron en placas Petri estériles en forma invertida.

v. Conteo de colonias

El conteo se realizó después de haber sido incubadas por un periodo de 24 horas. Se realizó en un contador de colonias tipo keebec en función del ufc/ml.

w. Procesamiento de datos

Una vez obtenida los datos número de microorganismo, se agruparon los datos en una hoja de cálculo de Excel para expresar el número de microorganismos en ufc/ml y log ufc/ml.

Con la ayuda de una hoja de cálculo Excel se graficó la curva de crecimiento y a través del método de las líneas se determinaron los parámetros experimentales de crecimiento para cada tratamiento, para luego ajustarlos con modelos de regresión no lineal cada uno de los modelos primarios.

x. Ajuste de la curva de crecimiento

Se procedió hacer el ajuste de los modelos primarios y secundarios usando el software Matlab R2013a a través de regresiones usando el método de Levenberg-Marquardt. Con base en los modelos seleccionados (primarios y secundarios), fue establecido y aplicado un modelo de crecimiento no isotérmico, Siendo la solución de esta Ecuación diferencial mediante la resolución numérica por el método de Runge Kutta de cuarto orden con la función ODE 45.

y. Interpretación de resultados

Finalmente se interpretaron los resultados en función a los parámetros y ajustes obtenidos por cada tratamiento.

3.3.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS**3.3.3.1 MICROORGANISMO Y EL MEDIO DE CULTIVO**

Las bacterias en estudio fueron del cultivo láctico (CHR-HANSEN FD-DVS R-707) Cultivo homofermentativo mesófilo, tipo O. El cultivo de Chr- Hansen proporciona cepas de *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. cremoris* que son resistentes a fagos, definidos para uso directo a la tina (DVS). Este cultivo contiene cepas

especialmente seleccionados, elegidos por su resistencia a los fagos y la capacidad de producir ácido láctico rápidamente. Este cultivo no produce CO₂.

3.3.3.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para la realización de los análisis microbiológicos se utilizó la metodología propuesta por la NOM-110-SSA1-1994. Utilizando 10 g de muestra de queso tipo paria, los cuales fueron diluidos en 90 ml de una solución de agua peptona al 25%. Posterior a eso se homogenizó en una licuadora doméstica hasta conseguir la muestra homogenizada, a partir de esa muestra se procedió para hacer las diluciones seriadas correspondientes.

3.3.3.3 PREPARACIÓN DE DILUCIONES

Las diluciones se prepararon a partir de una muestra homogenizada de queso tipo paria, previamente licuada, tomando de ella 1ml, que se diluyó en un tubo que contenía 9ml de agua peptona estéril al 0.1%. En seguida se agitó hasta conseguir una mezcla homogénea, luego se tomó 1ml para añadir a otro tubo con 9ml de agua peptona estéril al 0.1%, de la misma forma hasta conseguir la dilución deseada.

3.3.3.4 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Las muestras de queso tipo paria con cepas de *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, fueron cultivadas en medio de cultivo AGAR M17 Código: CM0785 de OXOID MICROBIOLOGY PRODUCTS siguiendo las instrucciones para su uso, se suspendió 48.25g en 950 ml de agua destilada y se llevó suavemente a ebullición esterilizando en autoclave a 121°C durante 15 minutos luego se enfría a 50°C y añadir 50 ml de solución de lactosa estéril (10% w / v). Para obtener la Solución de lactosa al 10% (w / v) se procedió de la siguiente forma; Disolviendo 10 g

de lactosa Código LP0070 en 100 ml de agua destilada. Esterilizando en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

3.3.3.5 SIEMBRA EN PLACA

Se utilizó el Agar M17 que previamente fue esterilizado en autoclave, en las placas que contendrán la muestra se les adiciona de 15-20 ml, de medio de cultivo a 40-45°C, se homogeniza las muestras, se dejan solidificar y se incuban a 37°C.

3.3.3.6 RECUENTO DE BACTERIAS LÁCTICAS

Transcurrida las 24 horas, la cuantificación se realizó contando el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (Ufc/ml) con la ayuda de un contador de colonias tipo keebec, para luego convertirlas en función de logaritmo.

3.3.3.7 OBTENCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

Una vez obtenido los datos del crecimiento de bacterias en ufc/ml se procede a trabajar en función al logaritmo, para homogenizar la varianza y luego se construyó la curva de crecimiento, es decir \log_{10} de ufc/ml de muestra vs tiempo en horas. Para la obtención de los parámetros de crecimiento (N_0 , A, B y M) se realizó el método de líneas en una hoja de cálculo en el software Excel 2010.

3.3.3.8 AJUSTE DE MODELOS MATEMÁTICOS

A. MODELOS PRIMARIOS

A partir de los datos de crecimiento de las BAL., obtenidos en las tres diferentes temperaturas de maduraciones experimentadas y evaluadas (9°C, 12°C y 15°C), diferentes modelos primarios fueron ajustados para la obtención de los parámetros de crecimiento:

duración de la fase lag (λ), velocidad específica máxima de crecimiento (μ) y aumento logarítmico de la población microbiana (A).

Los modelos primarios evaluados fueron: Modelo de Gompertz Modificado, Modelo Logístico, Modelo Logístico Modificado, y el modelo de Baranyi y Roberts. En la Tabla 3, se presenta las ecuaciones que representa cada modelo primario. Las curvas de crecimiento fueron evaluadas por el software Matlab R2013a (MathWorks®, Natick, USA).

Tabla 3. Modelos Primarios

| Modelos primarios | Ecuaciones |
|-----------------------------|---|
| Gompertz | $\text{Log}(N) = N_0 + A \exp\{-\exp[-B(t - M)]\}$ |
| Modificado | $\mu = \frac{A \cdot B}{e} \quad \lambda = M - \frac{1}{B}$ |
| Logístico | $\log(N) = N_0 + \frac{A}{\{1 + \exp[-B \cdot (t - M)]\}}$ |
| | $\mu = \frac{A \cdot B}{4} \quad \lambda = \frac{M - 2}{B}$ |
| Logístico modificado | $\log(N) = N_0 + \frac{A}{1 + \exp[-B * (t - M)]}$ |
| | $-\frac{A}{1 + \exp(B * M)}$ |
| | $\mu = \frac{A \cdot B}{4} \quad \lambda = \frac{M - 2}{B}$ |
| Baranyi-Roberts | $\log(N) = N_{max} + \ln\left(\frac{(-1 + \exp(B * \lambda) + \exp(B * t))}{(-1 + \exp(B * t) + \exp(B * \lambda + A))}\right)$ |

Donde $\log N$ es el logaritmo decimal de la cantidad microbiana en el tiempo t , N_0 es el valor de la asíntota inferior (equivalente al \log de la cantidad microbiana inicial), A es el aumento logarítmico de la cantidad microbiana (equivalente al \log del recuento microbiano máximo durante la fase estacionaria menos el \log del recuento inicial), B es la velocidad de crecimiento relativa en el tiempo (h^{-1}) y M es el tiempo requerido para alcanzar la velocidad de crecimiento máxima (h), N_{max} es el recuento microbiano máximo.

B. MODELOS SECUNDARIOS

Después de la obtención de los parámetros cinéticos de crecimiento a través del modelo primario (λ , μ , A), los modelos secundarios fueron ajustados y comparados para la selección del modelo que mejor se ajuste y describa la influencia de la variación de la temperatura sobre estos parámetros, los modelos secundarios fueron ajustados usando el software Matlab R2013a. En la Tabla 4, se puede observar los modelos usados para ajustar y describir los parámetros de crecimiento frente a la temperatura.

Tabla 4. Modelos Secundarios

| MODELOS SECUNDARIOS | ECUACIÓN |
|---------------------|--|
| Lineal | $k = b + rT$ |
| Raíz cuadrada | $k^{1/2} = b(T - T_{min})$ |
| Tipo arrhenius | $\ln k = a \left(\frac{1}{T} \right) + b$ |
| Potencia | $k = b.T^n$ |
| Exponencial | $k = a.exp(b.T)$ |

En la Tabla 4, se observa los modelos secundarios usados para describir la influencia

de la temperatura en los parámetros de crecimiento de las BAL. Donde k es el parámetro de interés del modelo, T es la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y T_{\min} es la temperatura mínima para el crecimiento o coeficiente del modelo y a, b, r ; son coeficientes de los modelos.

C. COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS MODELOS

La comparación estadística de los modelos matemáticos primarios y secundarios fue realizada a través de los siguientes índices estadísticos: coeficiente de correlación (R^2), error medio cuadrático (MSE) factor bias y factor de exactitud.

El coeficiente de correlación también llamado coeficiente de determinación o simplemente R^2 es una medida de la proporción de variación explicada por la Ecuación de regresión en relación a la variación total de las respuestas.

El cálculo del MSE, factor bias y factor exactitud fueron realizados a través de las ecuaciones descritas en el Tabla 5. (Sutherland *et al.*, 1994; Ross., 1996).

Tabla 5. Índices Estadísticos

| ÍNDICES ESTADÍSTICOS | ECUACION |
|----------------------|---|
| MSE | $MSE = \frac{\sum(\text{valor}_{\text{observado}} - \text{valor}_{\text{predicto}})^2}{n - p}$ |
| Factor bias | $\text{factor bias} = 10 \left(\frac{\sum \left(\frac{\log(\text{valor}_{\text{predicto}} / \text{valor}_{\text{observado}})}{n} \right)}{\right)$ |
| Factor exactitud | $\text{factor exactitud} = 10 \left(\frac{\sum \left \frac{\log(\text{valor}_{\text{predicto}} / \text{valor}_{\text{observado}})}{n} \right }{\right)$ |

En la Tabla 5 se observa los índices estadísticos para comparar y evaluar los modelos utilizados en la presente investigación; donde n es el número de datos experimentales y p es el número de parámetros del modelo para analizar estos índices, cuanto menor es el valor de MSE mejor es el ajuste del modelo a los datos experimentales. El factor bias representa la diferencia media entre los valores observados y predictas. Este factor es un desvío relativo medio. Si bias es igual a 1, la respuesta observada es igual a la respuesta predicta. Por lo tanto, cuando bias es mayor que 1, significa que el valor predicho es mayor que el observado. Cuando bias es menor que 1, significa que el valor predicho es menor que el observado. El factor exactitud es una medida de la diferencia media absoluta entre los valores predichos y observados. Cuanto mayor es el factor exactitud, menor será la exactitud de la estimación media (Ross., 1996).

D. MODELO MATEMATICO SOBRE CONDICIONES DE TEMPERATURAS VARIABLES (CONDICIONES NO ISOTÉRMICAS)

El modelo de crecimiento no isotérmico establecido en este estudio fue basado en la metodología descrita por Corradini y Peleg., (2005), según estos autores, los modelos primarios y secundarios, obtenidos a partir del ajuste de datos experimentales isotérmicos, pueden ser utilizados para predecir el crecimiento microbiano bajo una variedad de condiciones no isotérmicas. Estos modelos fueron utilizados para establecer las curvas de crecimiento no isotérmico, por la resolución numérica de una Ecuación diferencial, partiendo de la premisa que la velocidad de crecimiento no isotérmica momentánea es la velocidad isotérmica a la temperatura momentánea, a un determinado tiempo que le corresponde al nivel de crecimiento momentáneo de la población bacteriana (Zwietering *et al.*, 1991).

Con base en los ajustes realizados en condiciones isotérmicas, fue posible establecer un modelo de crecimiento no isotérmico. El modelo primario que represento mejor ajuste a las curvas de crecimiento de las bacterias en estudio, en todas las temperaturas evaluadas, fue el modelo de Gompertz modificado. A partir de este modelo, fueron obtenidos, los parámetros de crecimiento: duración de la fase lag (λ), velocidad específica máxima de crecimiento (μ) y aumento logarítmico de la población microbiana (A), en las diferentes temperaturas isotérmicas (9°C, 12 °C, 15 °C). En este trabajo se utilizó la reparametrización de la función de Gompertz modificado, es decir, Gompertz reparametrizado (Ecuación 19), para obtener la representación directa de los parámetros de interés, λ , μ y A (Zwietering *et al.*, 1991).

$$\log y = A(T) \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu(T) \cdot \exp(1)}{A(T)} (\lambda(T) - t) + 1 \right] \right\} \dots \dots (19)$$

Donde $\log y = \log N/N_0$ es el logaritmo en el tiempo t , siendo N las unidades formadoras de colonias en el tiempo t y N_0 la unidad formadora de colonias en el inicio, $A(T)$ es el aumento de la población microbiana, $\mu(T)$ es la velocidad específica máxima de crecimiento (h^{-1}), $\lambda(T)$ es la duración de la fase lag (h) y $\exp(1) = 2.7182$.

La velocidad de crecimiento isotérmica de acuerdo con este modelo es representada por la Ecuación 20.

$$\frac{dy(t)}{dt} = \mu(T) \cdot \exp(1) \cdot \exp \left\{ \frac{\mu(T) \cdot \exp(1) \cdot (\lambda(T) - t)}{A(T)} + 1 \right\} \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu(T) \cdot \exp(1) \cdot (\lambda(T) - t)}{A(T)} + 1 \right] \right\} \dots \dots (20)$$

La influencia de la temperatura sobre los parámetros primarios de crecimiento ($\lambda(T)$, $\mu(T)$ y $A(T)$) puede ser descrita por modelos secundarios, a través del modelo que presente mejor ajuste a los datos experimentales, para la aplicación del modelo no isotérmico es necesario conocer como estos parámetros de crecimiento varían con la temperatura, y como este varia con el tiempo, transformando los modelos secundarios en función del perfil de temperatura, es decir, $\lambda[T(t)]$, $\mu[T(t)]$ y $A[T(t)]$. De este modo, la velocidad de crecimiento del modelo no isotérmico se torna específico para cada tratamiento térmico estudiado.

Con la inclusión de los modelos secundarios y de las ecuaciones que representan los perfiles de temperatura $T(t)$ en la Ecuación 20, fue obtenido el modelo de crecimiento no isotérmico Ecuación 21.

$$\frac{dy(t)}{dt} = \mu(T(t)) \cdot \exp(1) \cdot \exp\left\{\frac{\mu[T(t)] \cdot \exp(1) \cdot (\lambda[T(t)] - t^*)}{A[T(t)]}\right\} \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu[T(t)] \cdot \exp(1) \cdot (\lambda[T(t)] - t^*)}{A[T(t)]}\right] + 1\right\} \dots \dots \dots (21)$$

Donde t^* está definido por la Ecuación 22 y representa el tiempo que corresponde a cualquier nivel de crecimiento isotérmico, y está dado por el desplazamiento de t en la Ecuación 19.

$$t^* = \left(\frac{\mu(T) \cdot \exp(1) \cdot (\lambda(T) + A(T) - \ln(-\ln(y/A(T))))}{\mu(T) \cdot \exp(1)} \right) \dots \dots (22)$$

En esta investigación, los modelos primarios y secundarios fueron ajustados usando el método de levenberg-marquardt y la solución numérica del modelo no isotérmico

(Ecuación diferencial de primer orden) fue realizada con el método de Runge-Kutta de cuarto orden, usando funciones ODE 45 en el software matlab R2013a.

A partir del modelo predictivo de crecimiento no isotérmico (Ecuación 21), se puede predecir el crecimiento de microorganismos cuando la temperatura de almacenamiento varía entre 9 y 15°C.

Para la aplicación del modelo no isotérmico, fue necesario describir el perfil de temperatura durante el almacenamiento. Los cambios en el perfil de temperatura pueden ser descritas por cualquier modelo matemático empírico, para facilitar el cálculo de las curvas de crecimiento no isotérmicas (Corradine y Peleg, 2005; Corradine *et al.*, 2006; Smith-Simpson *et al.*, 2007). En este estudio, el perfil de temperatura puede ser descrito por una Ecuación senoidal, representada por la Ecuación 23.

$$T(t) = a_1 \cdot \text{sen}(b_1 \cdot t + c_1) + a_2 \cdot \text{sen}(b_2 \cdot t + c_2) + \dots + a_8 \cdot \text{sen}(b_8 \cdot t + c_8) \dots (23)$$

Donde $T(t)$ es el perfil de temperatura (°C) en el tiempo t (h), y a_i , b_i y c_i son los parámetros del modelo. Además, con el fin de representar el perfil de temperatura experimental, una condición fue impuesta para el establecimiento de la Ecuación, es decir, si $T \leq T_1$, $T = T_1$ y si $T \geq T_2$, $T = T_2$ donde T_1 es la menor temperatura (°C) y T_2 es la mayor temperatura (°C) definida por el perfil no isotérmico. Esto quiere decir que, por ejemplo, cuando $T \leq 9^\circ\text{C}$, T será fijado en 9°C y cuándo $T \geq 15^\circ\text{C}$, T será fijado en 15°C . Con estas condiciones, las temperaturas estarán dentro del perfil estudiado (9-15°C).

3.3.4 UNIDADES DE ANÁLISIS Y OBSERVACIONES

Variables de estudio

a) Temperaturas (°C)

- 9°C, 12°C, 15°C, 9°C-15°C.

b) Tiempos de control (horas)

- 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 192.

c) Modelos matemáticos

- Modelos primarios
- Modelos secundarios

Variables de respuesta

- Logaritmo de crecimiento de microorganismos (Log (ufc/ml) a diferentes tiempos y temperaturas de maduración.
- Obtención de los parámetros de crecimiento bacteriano mediante el ajuste de los modelos primarios (A, B, M, N0)
- Ajuste de los modelos secundarios para describir los parámetros cinéticos de crecimiento derivados del modelo primario (λ , μ , A).

3.4 METODOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.4.1 DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS EN UFC/ML EN LA MADURACIÓN DEL QUESO TIPO PARIÁ

Para procesar los datos obtenidos durante la investigación se aplicó el análisis de varianza (ANOVA), con un 95.0% de significancia. Se trabajó con el programa estadístico STATGRAPHICS Centurión XVI (Statistical Graphics Corp.).

Las variables de estudio fueron las unidades formadoras de colonia por mililitro a diferente temperatura y tiempo de maduración en el queso Tipo Paria. Se utilizó un experimento factorial de dos factores bajo el diseño completo al azar (DCA) con 3 repeticiones, el diseño consiste en escribir una Ecuación matemática que permite determinar de manera teórica el valor de la respuesta observada (Ufc/ml). Siempre en un arreglo experimental bajo un DCA con dos factores, la respuesta observada se puede modelar como;

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \dots \dots \dots (24)$$

$i = 1,2,3, \dots, 12$ (tiempos de maduración)

$j = 1,2,3$ (temperaturas de maduración)

$k = 1,2,3$ (determinación)

Dónde:

Y_{ijk} = Es la variable de respuesta del k-ésimo determinación bajo el j-ésimo temperatura sujeto al i-ésimo tiempo.

μ = Constante, media de la población a la cual pertenecen las determinaciones.

α_i = Efecto del i – ésimo nivel de tiempo

β_j = Efecto del j – ésimo temperatura

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción del i – ésimo nivel de tiempo, en el j – ésimo nivel de temperatura.

ε_{ijk} = efecto del error experimental.

3.4.2 DETERMINACIÓN DE PARAMETROS PARA EL AJUSTE DE MODELOS PRIMARIOS EN LA MADURACIÓN DEL QUESO TIPO PARIA

Para comparar las muestras obtenidas a diferentes temperaturas y con sus respectivas repeticiones se aplicó el análisis de varianza (ANOVA), con un 95.0% de

significancia. Se trabajó con el programa estadístico STATGRAPHICS Centurión XVI (Statistical Graphics Corp.).

Las variables de estudio fueron los parámetros de ajuste de los modelos (N_0 , B, A y M). Se utilizó un experimento de un factor (Temperatura), bajo el diseño completo al azar (DCA) con 2 repeticiones, el diseño consiste en escribir una Ecuación matemática que permite determinar de manera teórica el valor de la respuesta observada. Siempre en un arreglo experimental bajo un DCA con un factor, la respuesta observada se puede modelar como:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \dots \dots \dots (25)$$

$i = 1,2,3$, (temperaturas de maduración)

Dónde:

Y_{ij} = Es la variable de respuesta en la observación j del tratamiento i

μ = Constante, media general o media de la población a la cual pertenecen las determinaciones.

τ_i = Efecto del i – ésimo temperatura

ε_{ij} = es el residuo o error aleatorio que existe dentro de cada tratamiento, entre los parámetros.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 OBTENCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DE BACTERIAS LÁCTICAS MEDIANTE EL AJUSTE DE LOS MODELOS PRIMARIOS

Las unidades formadoras de colonias obtenidas en este experimento se realizaron mediante la técnica de recuento en placa, por ser un método sencillo y preciso ampliamente usado. Siendo las unidades de medición ufc/ml, el análisis de varianza (ANOVA) del log ufc/ml del recuento de bacterias en función a la temperatura y el tiempo se muestra en el anexo 1, en donde los factores de temperatura y tiempo tienen un efecto estadísticamente significativo sobre log (ufc/ml) con un 95.0% de nivel de confianza.

En la Tabla 6, se muestra los parámetros obtenidos a través de los experimentos realizados obtenidos mediante el método de líneas.

Tabla 6. PARAMETROS OBTENIDOS MEDIANTE EL METODO DE LINEAS

| | 9°C | 12°C | 15°C |
|------------------------|--------|--------|--------|
| N₀ | 5.370 | 5.800 | 5.820 |
| | 5.800 | 5.790 | 5.760 |
| | 6.280 | 5.850 | 5.920 |
| B | 0.054 | 1.530 | 0.036 |
| | 0.020 | 0.050 | 0.045 |
| | 0.023 | 0.054 | 0.055 |
| A | 2.480 | 2.250 | 2.400 |
| | 2.040 | 2.250 | 2.060 |
| | 1.490 | 2.150 | 2.210 |
| M | 37.000 | 70.500 | 35.150 |
| | 54.500 | 37.050 | 34.500 |
| | 67.250 | 36.475 | 36.750 |
| N_{max} | 7.980 | 8.050 | 8.220 |
| | 7.840 | 8.040 | 7.820 |
| | 7.770 | 8.000 | 8.130 |

Valbuena *et al.*, (2008), menciona que utilizando estos coeficientes de regresión, y con los mismos datos de crecimiento bacteriano, en un trabajo previo fue posible hallar los descriptores de la cinética de crecimiento, entre ellos la fase de adaptación (λ), tasa específica de crecimiento (μ), tiempo de generación (T_g).

4.1.1 ANALISIS DE LOS PARAMETROS DE AJUSTE DE LA CURVA OBTENIDO A DIFERENTES TEMPERATURAS

En las Tablas 7, 8, 9, 10, 11; se muestra el análisis de varianza de los parámetros de ajuste de la curva de crecimiento. Se observa en las Tablas 7, 8, 9, 10, 11; que en todos los parámetros no existe diferencia estadísticamente significativa por el factor temperatura con un nivel de confianza del 95%, esto se debe a que las temperatura de estudio (9, 12, 15°C), son temperaturas cercanas con una diferencia de ± 2 grados centígrados de diferencia.

Tabla 7. Análisis de varianza (ANOVA) del parámetro N_0 (Log del recuento inicial)

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 0.000688889 | 2 | 0.000344444 | 0.00 | 0.9952 |
| Intra grupos | 0.4296 | 6 | 0.0716 | | |
| Total (Corr.) | 0.430289 | 8 | | | |

Tabla 8. Análisis de varianza (ANOVA) del parámetro A (log del recuento microbiano máximo durante la fase estacionaria menos el Log del recuento inicial)

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 0.0939556 | 2 | 0.0469778 | 0.51 | 0.6264 |
| Intra grupos | 0.5568 | 6 | 0.0928 | | |
| Total (Corr.) | 0.650756 | 8 | | | |

Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) del parámetro B (velocidad de crecimiento relativa en el tiempo)

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 0.511988 | 2 | 0.255994 | 1.05 | 0.4052 |
| Intra grupos | 1.45722 | 6 | 0.24287 | | |
| Total (Corr.) | 1.96921 | 8 | | | |

Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA) del parámetro M (tiempo requerido para alcanzar la velocidad de crecimiento máxima)

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 485.888 | 2 | 242.944 | 1.19 | 0.3665 |
| Intra grupos | 1222.95 | 6 | 203.825 | | |
| Total (Corr.) | 1708.84 | 8 | | | |

Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) del parámetro N_{max} (recuento microbiano máximo)

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 485.888 | 2 | 242.944 | 1.19 | 0.3665 |
| Intra grupos | 1222.95 | 6 | 203.825 | | |
| Total (Corr.) | 1708.84 | 8 | | | |

Las Tablas 7, 8, 9, 10 y 11 nos indican que las temperaturas de 9, 12, 15 °C no existen diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros obtenidos por el método de líneas N_0 , B, A, M y N_{max} parámetros que describen la curva de crecimiento bacteriano del queso tipo paria en diferentes temperaturas, ya que son temperaturas de estudio muy próximas.

4.1.2 MODELOS PRIMARIOS

En la Tabla 12, se muestran diferentes valores de los índices estadísticos obtenidos para los modelos ajustados para la maduración del queso tipo paria en las tres temperaturas diferentes de maduración. Los índices estadísticos calculados mostraron que todos los modelos representaban bien el comportamiento del crecimiento de las BAL. Sin embargo, el análisis visual de estos datos mostró que los modelos logísticos y Baranyi y Roberts no describieron muy bien la fase de latencia de las curvas de crecimiento.

Tabla 12. Valores e índices estadísticos de diferentes modelos ajustados

| Temperatura/ Índices | Modelos | | | |
|-------------------------|------------------------|-----------|-------------------------|----------------------|
| | Gompertz Modificado | Logístico | Logístico Modificado | Baranyi y Robertz |
| 9 ° C | | | | |
| R² | 0.9998 | 0.9985 | 0.9986 | 0.9983 |
| MSE | 0.0152 | 0.04142 | 0.03995 | 0.04371 |
| Bias | 1.000002 | 1.000009 | 0.999971 | 0.89942 |
| Exactitud | 1.0012121 | 1.0037156 | 1.0037263 | 1.2135108 |
| 12 ° C | | | | |
| R² | 0.9997 | 0.9996 | 0.9996 | 0.9995 |
| MSE | 0.0239 | 0.02581 | 0.02581 | 0.02969 |
| Bias | 0.999968 | 0.999902 | 0.999932 | 0.878432 |
| Exactitud | 1.001749 | 1.0021114 | 1.0021065 | 1.2462635 |
| 15 ° C | | | | |
| R² | 0.9999 | 0.9998 | 0.9998 | 0.9996 |
| MSE | 0.016 | 0.02244 | 0.02244 | 0.02885 |
| Bias | 1.000018 | 1.000012 | 0.999952 | 0.952107 |
| Exactitud | 1.0010542 | 1.0016531 | 1.0016548 | 1 |

Como se puede observar en la Tabla 12, los índices estadísticos de los modelos logístico y Baranyi-Roberts son ligeramente inferiores a los valores observados para Gompertz modificado y logístico modificado, con un rendimiento ligeramente superior para el modelo de Gompertz modificado, que era el único que mostró coeficientes de

correlación cercanos a 1, para todas las temperaturas. También se observaron los valores más bajos del error cuadrático medio para el Modelo de Gompertz modificado. En cuanto al factor Sesgo y exactitud los valores más cercanos a 1 también fueron obtenidos para el modelo Gompertz modificado, que es por lo tanto el modelo que mejor se ajusta a los datos.

Todo ello indica que el modelo de Gompertz modificado a través del análisis de los índices estadísticos presenta un mejor ajuste a las curvas de crecimiento de la cepa de *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. cremoris*. Por lo tanto, este modelo fue elegido para el cálculo de los parámetros de crecimiento mostrados en la Tabla 13. Juneja y Marks, (1999) evaluaron los modelos de Gompertz, Baranyi y Robertz y el modelo Logístico a los datos de crecimiento de *salmonella* y mostraron que el modelo Logístico represento mejor los datos experimentales. Estos resultados también coinciden con los reportados por Slongo *et al.*, (2009) Quien estudió la influencia del nivel de presión y tiempo de mantenimiento durante tratamiento de alta presión de jamón en el crecimiento de BAL en lonchas de jamón envasados al vacío, estos autores informaron, los modelos de Gompertz y logística modificados fueron capaces de describir el crecimiento microbiano en el jamón; sin embargo, el modelo de Gompertz tuvo un rendimiento ligeramente superior. Zwietering *et al.*, (1990) compararon varias funciones sigmoideas (Logística, Gompertz, Richards, Schnute y modelos de Stannard) para describir las curvas de crecimiento de *L. plantarum* en caldo MRS a diferentes temperaturas (6°C a $42,8^{\circ}\text{C}$), estos autores concluyeron que todas las curvas de crecimiento estaban mejor equipados con el modelo de Gompertz.

En la anexo 4, se presentan los parámetros de ajuste, N_0 , B, A y M, obtenidos como salida del proceso iterativo para cada conjunto de datos, agrupados por temperatura con cada modelo primario aplicado. Es necesario aclarar que el modelo de Baranyi y Roberts no utiliza el parámetro M. En el anexo 4 se presentan el (R^2) de los diferentes modelos ajustados al crecimiento de cultivos lácticos. Se observa que el R^2 para temperatura 9°C es casi igual para los cuatro modelos aplicados y para resto de las temperaturas están por encima de 0.99 lo cual significa que todos los modelos ajustaron bien a los datos experimentales.

Para hacer una mejor evaluación del ajuste de cada modelo utilizado, se presentan en el Anexo 3, correspondientes a las curvas de crecimiento obtenidas a cada temperatura y los valores estimados obtenidos como resultado al utilizar los diferentes modelos primarios.

Los parámetros cinéticos de la curva de crecimiento de las bacterias lácticas derivados de los modelos de regresión son; el tiempo de latencia (λ), la tasa máxima de crecimiento exponencial (μ), tal como se muestra en la Tabla 8. El parámetro aumento logarítmico de la población (A) se obtiene directamente del modelo de regresión.

En la Tabla 13, se encuentran los parámetros microbiológicos más importantes que derivan de la aplicación del modelo de regresión utilizado y escogido como fue el modelo de Gompertz modificado, cuyas ecuaciones fueron previamente descritas en la Tabla 3 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) se hace mínimo cuando la temperatura se acerca al óptimo, aumentando gradualmente conforme la temperatura se aleja de este punto, Zarate., (2009) estudio el comportamiento del *Lactococcus lactis subsp. lactis*, donde menciona que la fase lag (λ) a 10°C es muy extensa y que culmina a las 17.43 horas, lo cual se aproxima con nuestro resultado obtenido ya que a una temperatura de 10°C la fase lag de acuerdo a nuestra investigación termina a las 19.06 horas, esto se debe que durante el tiempo de adaptación muchas células bacterianas contenidas en el inóculo pueden morir y sólo las que sobrevivieron establecieron la curva de crecimiento cuya tasa de crecimiento total fue de 0.02 log ufc/ml/h; mientras tanto para la tasa máxima de crecimiento (μ) y el aumento logaritmo de la población bacteriana (A) el comportamiento es inverso, ya que a mayor temperatura mayores valores se obtiene, dada su naturaleza.

Tabla 13. Parámetros biológicos derivados del ajuste del modelo primario.

| TEMPERATURAS | λ (h) | μ Log ufc/ml/h | A |
|--------------|---------------|-----------------------|-------|
| 9°C | 20.16111039 | 0.023580197 | 2.069 |
| 12 °C | 17.24620314 | 0.033831076 | 2.224 |
| 15 °C | 13.24246859 | 0.042727858 | 2.354 |

4.2 DETERMINACION DEL MODELO SECUNDARIO

En este estudio, se evaluaron cinco ecuaciones matemáticas para representar los modelos secundarios: lineal, raíz cuadrada, de tipo Arrhenius, potencia y exponencial. Estos modelos describen cómo la temperatura (entre 9 y 15°C) influye en los parámetros de crecimiento del *Lactococcus láctis*. Estas ecuaciones se ajustaron a los parámetros de

crecimiento de Gompertz modificado (λ , μ y A) y se compararon mediante el índice estadístico R^2 .

En las Figuras 3, 4 y 5, se muestra el mejor ajuste mostrado por los modelos secundarios seleccionados para μ (modelo de la raíz cuadrada), para A (Ecuación de potencia), y para λ (Ecuación exponencial).

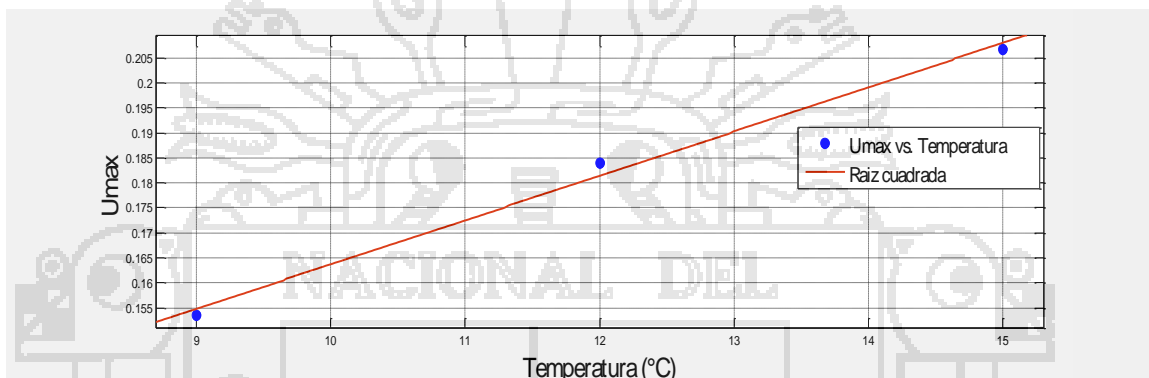


Figura 3. Ajuste de la Ecuación Raíz Cuadrada para el parámetro μ

En la Figura 3, puede apreciarse la bondad del ajuste encontrado al emplear el modelo descrito, en éste solo se observa un punto relativamente alejado de la curva calculada, correspondiente a la temperatura de 12°C

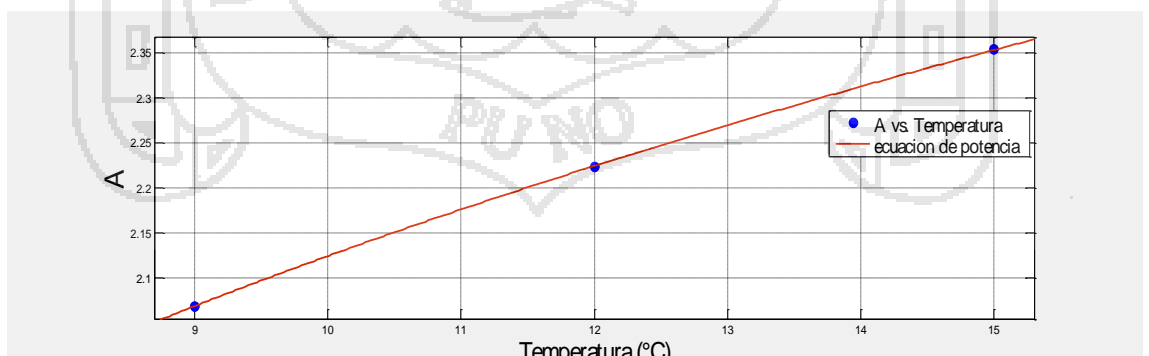


Figura 4. Ajuste de la Ecuación de Potencia para “A”

En la Figura 4, se presenta la curva de ajuste obtenida al representar gráficamente los valores predichos. En el mismo se aprecia como la línea de valores ajustados, que

representa un buen compromiso entre los puntos obtenidos con los parámetros de regresión “A”. Siendo el coeficiente de determinación R^2 igual a 1.

En la Figura 4, se aprecia como el parámetro “A” aumenta en forma proporcional a la temperatura, con un comportamiento aparentemente lineal, sin embargo, al aplicar diversos modelos matemáticos, se logró establecer que el comportamiento de este parámetro no era realmente lineal, lo cual es lógico, conociendo que la temperatura óptima del *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. Cremoris* está alrededor de los 37°C, por lo tanto las funciones relativas a la temperatura no deberían presentar un comportamiento lineal cuando este punto óptimo no se encuentra dentro del rango en estudio. En este caso pudo comprobarse que el parámetro “A” era mejor modelado aplicándola Ecuación de potencia (Ratkowsky *et al.*, 1982).

En la Figura 5 correspondiente al modelo secundario para la fase de adaptación o de latencia, se aprecia como la línea de ajuste representa o asemeja una Ecuación exponencial. Donde a mayor temperatura el tiempo de adaptación es menor.

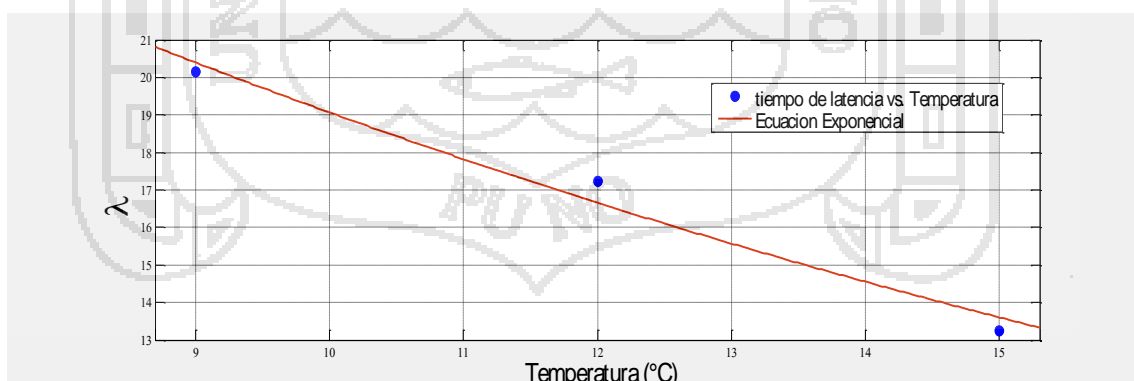


Figura 5. Ajuste de la Ecuación Exponencial para el tiempo de latencia “ λ ”

Los resultados de las ecuaciones ajustados (modelos secundarios aplicados) para la cepa bacteriana en estudio, se muestran en la Tabla 14. Los modelos han mostrado buenos coeficientes de regresión. Así, es posible predecir los parámetros de crecimiento del *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. cremoris* en el intervalo de temperaturas estudiado en esta investigación (9 ° C, 12° C y 15 ° C). Aunque se desarrollaron los experimentos en pequeñas cantidades, estos modelos podrían ser útiles en la industria quesera, lo que permite una mejor comprensión del comportamiento de la cepa. En estudio en función a la temperatura con cada parámetro de crecimiento en el queso tipo paria.

Tabla 14. Modelos Secundarios Ajustados para cada parámetro de crecimiento de BAL.

| PARAMETROS | ECUACION | R ² |
|----------------|--|----------------|
| $\lambda(h)$ | $\lambda = 37.47 * \exp(0.06756 * T)$ | 0.9779 |
| $\mu (h^{-1})$ | $\sqrt{\mu} = (0.008858 * (T - (-8.478)))$ | 0.9983 |
| A | $A = 1.187 * T^{0.2526}$ | 1 |

Se realizó el análisis de los modelos secundarios en donde se escogió un solo modelo para representar la influencia de la temperatura sobre cada parámetro de crecimiento. En general, la influencia de la variación de la temperatura en la fase Lag o de latencia (λ) fue mejor representada por la Ecuación exponencial, en donde la ecuación exponencial mostro un coeficiente de correlación de 0,9779 lo cual indica que el modelo si es apto para predecir el parametro (λ). Para el parámetro tasa de crecimiento (μ) la influencia de la temperatura fue mejor descrita por el modelo de la raíz cuadrada. Para el incremento logarítmico de la población (A), la Ecuación de potencia mostró los mejores ajustes con

un coeficiente de correlación R^2 de 1 todo ello indica que el modelo describe perfectamente el parámetro en el rango de temperatura.

Los resultados obtenidos en este estudio están de acuerdo con los resultados reportados en la literatura. Corradini y Peleg., (2005) demostraron que la influencia de la temperatura sobre los parámetros de crecimiento microbiano puede ser descrita por otras ecuaciones empíricas, tales como la ecuación exponencial, ecuación de tipo Arrhenius, polinomial, lineal, y la ecuación de la raíz cuadrada.

La Ecuación de la raíz cuadrada es probablemente el modelo más estudiado y ampliamente utilizado para analizar el efecto de la la temperatura en la tasa de crecimiento microbiano específico. Cayré *et al.*, (2003) investigaron el efecto de tres temperaturas (0 ° C, 8 ° C y 15 ° C) sobre el crecimiento de BAL en emulsiones de carne cocinados envasados en películas con baja permeabilidad al oxígeno.

Los modelos de raíz cuadrada y lineal fueron capaces de describir el efecto de las diferentes temperaturas en el parámetro μ , pero el modelo de la raíz cuadrada fue el que obtuvo un rendimiento ligeramente superior.

La elección del modelo secundario se basa en la comparación de los coeficientes de correlación (R^2) obtenida por ajustes de cinco modelos secundarios, como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Los coeficientes de Correlación (R^2) obtenida por ajustes de los Modelos Secundarios

| MODELOS SECUNDARIOS | COEFICIENTE DE CORRELACION (R^2) | | |
|------------------------|--------------------------------------|---------------|---------------|
| | λ | μ | A |
| Lineal | 0.9918 | 0.9983 | 0.9974 |
| Raíz cuadrada | -0.007747 | 0.9983 | 0.9974 |
| Tipo arrhenius | 0.9463 | 0.9895 | 0.9914 |
| potencia | 0.9531 | -18.2 | 1.0000 |
| exponencial | 0.9779 | 0.985 | 0.9952 |
| Hiperbólico | 0.9594 | -0.1411 | -0.0003456 |

Mediante el análisis de la Tabla 15, para el parámetro λ a pesar que la Ecuación lineal tiene un R^2 mas cercano a 1 se opto por la ecuacion exponencial, este último fue seleccionado, dado que en el crecimiento de bacterias es muy poco probable que la fase de latencia o de adaptacion de acuerdo a la temperatura sea una linea recta, tal como lo indica Hudson., (1993) que ha demostrado que la duracion de la fase lag depende de la temperatura. Para el parámetro “ μ ”, el modelo de la raíz cuadrada y la ecuacion lineal, mostraron un coeficiente de correlación casi iguales, por lo que se realizó el análisis de los indices estadísticos MSE, factor de sesgo (Bf) y factor de exactitud (Af) mostrando una ligera diferencia a favor del modelo de raiz cuadrada, mas aun varios investigadores indican que el parámetro de “ μ ” es mejor ajustado por la ecuacion de raiz cuadrada tal como lo describe Dalcalton., (2010) donde indica que el modelo de la raiz cuadrada ajusta bien la tasa de crecimiento de BAL con un $R^2=0.970$, para nuestro estudio el modelo se ajusto con R^2 de 0.998 que nos indica que nuestro ajuste es muy confiable. Para el parámetro “A”, se puede observar que la ecuacion de potencia fue el unico que presento

un R^2 igual a uno lo que indica que esta ecuacion describe perfectamente el parametro dentro de las temperaturas en estudio.

En la Tabla 16, se presenta los valores de los parámetros de crecimiento observados y predichos por los modelos secundarios obtenidos del ajuste de datos. Para evaluar la predicción de los modelos secundarios se calcularon factores de sesgo y precisión para los modelos secundarios. Analizando el factor sesgo (Bf) entre los valores observados y los predichos para los parametros(λ , μ y A) se observa que estan por encima muy cerca a uno excepto el parametro de A con un valor de sesgo de 0.99 lo cual indica una ligera variacion. El factor de exactitud (Af) se mostró para todos los parametros (λ , μ y A) por encima muy cerca a uno, lo cual indica la poca variación entre los valores observados y predichos para la BAL.

Tabla 16. Valores de los parámetros de crecimiento observados (obs) y valores predichos (pred) por el modelo secundario seleccionado y sus respectivos índices estadísticos sesgo y exactitud.

| Temperatura | $\lambda(h)$ | | $\mu(h-1)$ | | A | |
|-------------|--------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|
| | Obs. | Pred. | Obs. | Pred. | Obs. | Pred. |
| 9° C | 20.16111 | 20.399301 | 0.0235809 | 0.0238049 | 2.069 | 2.0677231 |
| 12° C | 17.246203 | 16.656835 | 0.0338321 | 0.0333779 | 2.224 | 2.2235756 |
| 15° C | 13.242469 | 13.600963 | 0.0427291 | 0.0429509 | 2.354 | 2.3525094 |
| Sesgo | 1.0012292 | | 1.00037033 | | 0.99951958 | |
| Exactitud | 1.00816965 | | 1.00313211 | | 1.00016019 | |

Los resultados obtenidos en la Tabla 16 son similares a los obtenidos por Mataragas *et al.*, (2006), quien reportó valores de Af de 0,98 y 1,19 así como Bf de 1,05 y 1,22. Además Ross, (1996) afirma que valores de Af entre 0,9 a 1,0 o 1,0 a 1,05 se consideraran adecuados, mientras que para Bf entre 0,7 a 0,9 o 1,06 a 1,15 son considerados aceptables

al momento de realizar predicciones de la estimación de los parámetros cinéticos de crecimiento de los microorganismos.

Las Figuras 6, 7 y 8 muestran los valores observados vs valores de los modelos predictos para los tres parámetros de crecimiento de BAL. Mediante el análisis de la Tabla 16, se puede ver que los valores pronosticados y observados se encuentran cerca de la línea de tendencia. El análisis conjunto de estas cifras, así como los valores de los factores de sesgo (B_f) y exactitud (A_f) de la Tabla 16, muestran que las modelos secundarios propuestos se pueden utilizar para predecir los parámetros de crecimiento de esta BAL en el intervalo de 9°C a 15°C .

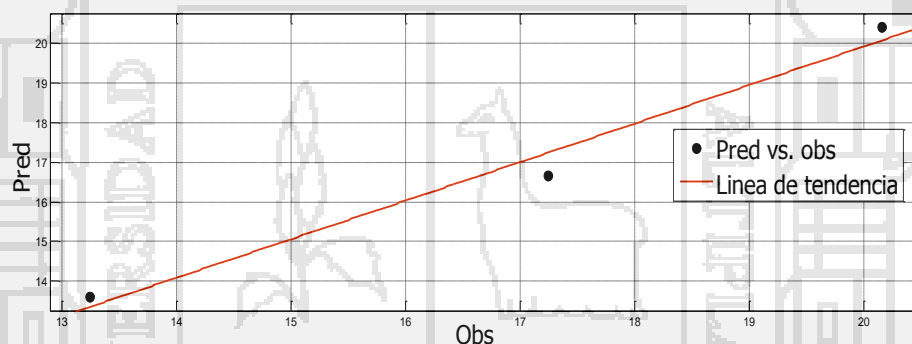


Figura 6. Relación entre los parámetros “ λ ” de crecimiento observado vs predicho

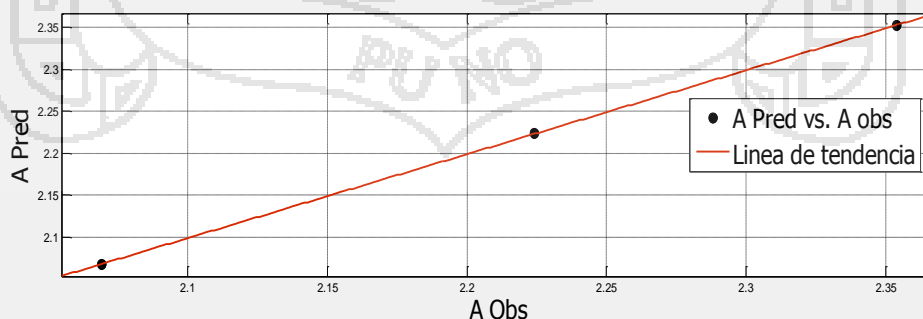


Figura 7. Relación entre los parámetros “A” de crecimiento observado vs predicho

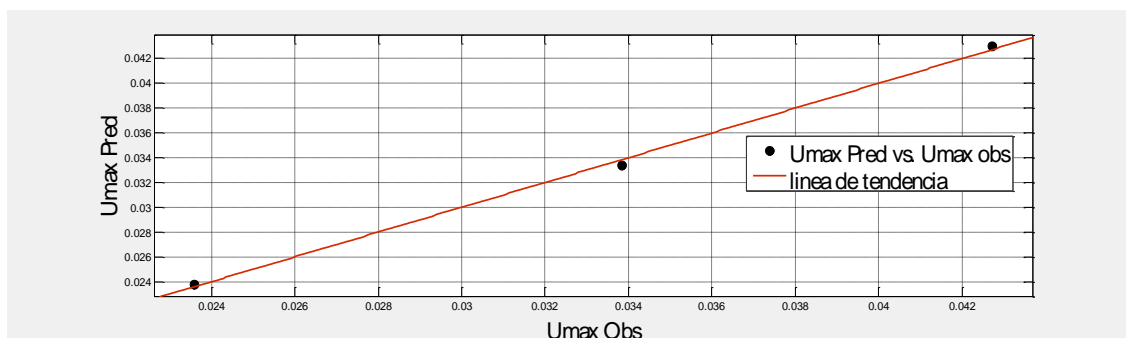


Figura 8. Relación entre los parámetros “ μ ” de crecimiento observado vs predicho

En las Figura 6, para el parámetro “ λ ” se observa una desviación de la línea de tendencia lo cual indica que el modelo ajustado muestra una variación al hacer el ajuste. En la Figura 7 para el parámetro “A” los datos se encuentran dentro de la línea de tendencia todo ello contrasta con el R^2 obtenido igual a 1. En la Figura 8 que los datos se ajustaron bien al modelo, tal como se aprecia los puntos en la línea de tendencia con un ligero desliz a temperatura de 12°C.

4.3 MODELOS MATEMÁTICOS EN CONDICIONES DE TEMPERATURA VARIABLES

A partir de los ajustes de los modelos primarios y secundarios, fue posible establecer un modelo no isotérmico para predecir el comportamiento de BAL dentro del rango de temperatura estudiado (9 ° C a 15 ° C), en virtud de la fluctuación de las condiciones de temperatura. Según Corradini y Peleg (2005), la calidad de las estimaciones del modelo no isotérmico depende de la calidad de los datos de crecimiento isotérmico original y esto depende del número de temperaturas examinado y el período entre ellos. Estos autores afirman que si los modelos secundarios describen así la dependencia de los parámetros de crecimiento en relación con la temperatura, el modelo no isotérmico debe predecir el crecimiento microbiano con suficiente precisión.

En la Tabla 17 se observa la comparación entre los valores predichos por el modelo no isotérmico y los datos observados experimentalmente, utilizando los índices estadísticos, MSE, factor sesgo y factor de exactitud. Se observa una buena relación entre las predicciones del modelo no isotérmico y los obtenidos experimentalmente, a pesar de la capacidad de predicción inferior del modelo de la curva de crecimiento experimental obtenido para el perfil de temperatura de 9-15 ° C.

En este estudio, como se ve en la Figura 22, y en la Tabla 17, el modelo no isotérmico predijo casi de forma satisfactoria el crecimiento de la cepa de *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. cremoris* en la maduración del queso tipo paria en el perfil de temperatura variable de 9 -15°C.

Tabla 17. Índices estadísticos para el perfil de temperatura de 9-15°C

| Tiempo | Observados | Predictos |
|------------------|-------------------|------------------|
| 0 | 5.82 | 5.82 |
| 24 | 6.12 | 6.35 |
| 48 | 6.84 | 7.15 |
| 72 | 7.45 | 7.55 |
| 96 | 7.75 | 7.60 |
| 120 | 7.90 | 7.62 |
| 144 | 7.94 | 7.75 |
| MSE | | 0.03 |
| Sesgo | | 1.00712693 |
| Exactitud | | 1.01670746 |

En la Tabla 17, se observa los índices estadísticos obtenidos al comparar los datos observados u obtenidos experimentalmente a una temperatura de varían con de 9-15°C, donde el error cuadrado medio fue de 0.03 lo cual indica que el modelo no isotérmico si mostro relación con los datos obtenidos experimentalmente. También se observa los índices de sesgo y exactitud que son mayores a 1 lo cual indica que los datos obtenidos

varían en un pequeño porcentaje, por lo que se podría concluir que con estos valores obtenidos se puede validar este modelo.

Juneja y Marks., (1999) afirmaron que la capacidad predictiva de los modelos en condiciones no isotérmicas dependen del desempeño de los modelos primarios y secundarios, lo que se puede verificar en este trabajo, además de eso los resultados indican que las respuestas microbianas a las variaciones bruscas de temperatura son de difícil predicción, donde la incorporación de los complejos mecanismos de adaptación microbiana a los modelos predictivos es un desafío a ser enfrentado por los investigadores.

Las Figura 9, muestra las curvas de crecimiento observadas experimentalmente y las predictas por el modelo no isotérmico de *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. cremoris*.

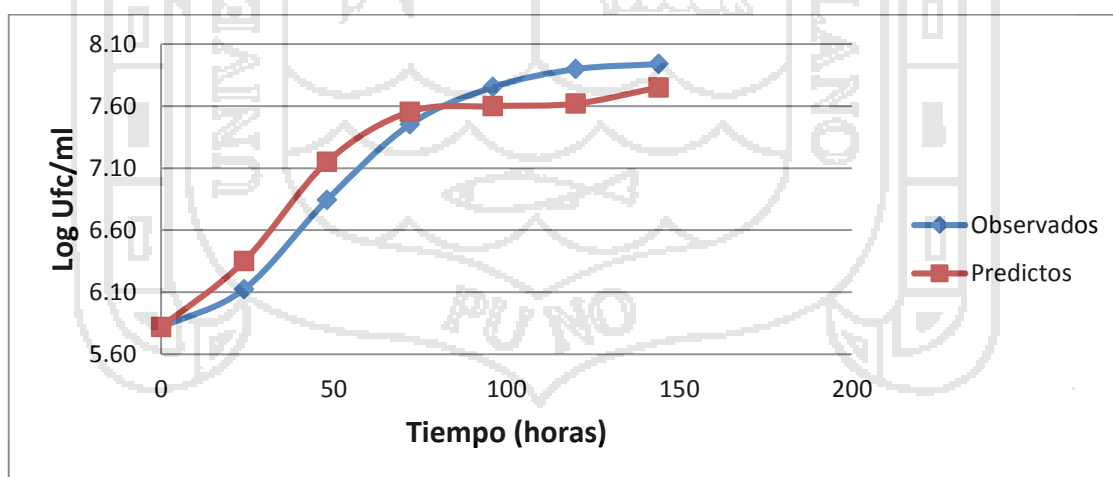


Figura 9. Curva de Crecimiento en condiciones no Isotérmicas predictos por el modelo no isotérmico.

En la Figura 9, se observa la Curva de crecimiento de *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. cremoris* en condiciones no isotérmicas. La línea roja es la predicción del modelo no isotérmico determinado a cualquier tiempo y la línea azul son los datos obtenidos experimentalmente con una variación de 9-15°C a cada 12 horas.

En la Figura 9, se observa como el modelo no isotérmico va describiendo bien la curva comparados a los recuentos obtenidos en condiciones isotérmicas, pero una vez en el tiempo de 72 horas alcanza un recuento de log 7,55 ufc/ml, el comportamiento muestra una tendencia de la fase estacionaria, mientras que los datos obtenidos experimentalmente se observa que sigue la fase exponencial algo similar a los datos obtenidos en condiciones isotérmicas, esta variación indica que el modelo no isotérmico difiere con los datos reales que podría deberse a diversos factores tales como: los modelos isotérmicos evaluados en otras investigaciones fueron evaluadas en cultivos puros, en este trabajo se realizó el cultivo en el queso tipo paria; también podría ser que el modelo secundario utilizado en este estudio presenta solo tres temperaturas experimentales; lo que podría llevar a la variación de resultados, tal como lo menciona Sarmiento., (2006) donde indica que menores temperaturas en estudio el error podría ser mayor.

En la Figura 10, se muestra las Curvas de crecimiento de *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. Cremoris* en condiciones isotérmicas y no isotérmicas. Curvas de crecimiento experimental y predicha. En pocas palabras: la temperatura T (t) perfil. Líneas (-) indican los ajustes de los modelos y los símbolos representan los datos experimentales. 9 ° C (▲) 12 ° C (x) y 15°C (*), 9-15 ° C obs (◆); 9-15 ° C pred (■);

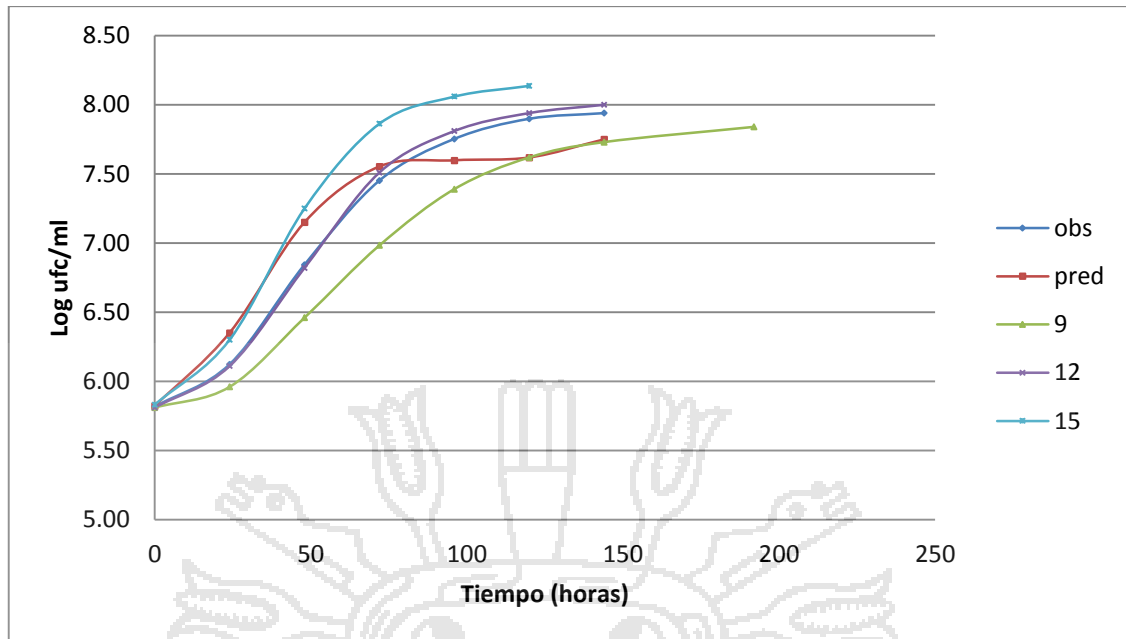


Figura 10. Curva de crecimiento en condiciones isotérmicas y no isotérmicas

Los valores de los parámetros y los índices obtenidos por la Ecuación 23 para describir el perfil de temperatura se presentan en la Anexo 5. La descripción del perfil es específica en tiempo-temperatura obtenido durante los experimentos no isotérmicos. Esta Ecuación describe el perfil de temperatura de 9-15°C con un intervalo de 12 horas.

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron los parámetros de la curva de crecimiento a través del método de líneas (A, B, C y M), en la maduración del queso tipo paria en condiciones isotérmicas, mediante el ajuste de los diferentes modelos primarios se obtuvieron los parámetros biológicos (λ , μ , y A) siendo los datos obtenidos por los modelos confiables.
- Los modelos secundarios utilizados en este trabajo resultaron apropiados para describir los parámetros microbiológicos (λ , μ , A) que permiten predecir la cinética de crecimiento del microorganismo en función a las temperaturas de estudio.
- Fue posible establecer un modelo de crecimiento no isotérmico para el crecimiento de la cepa *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. cremoris* en el queso tipo paria, el modelo fue validado con en el perfil de temperatura de variación entre 9-15°C.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda hacer la comparación de los modelos con una mayor cantidad de datos y bajo diferentes condiciones de crecimiento, a fin de determinar cómo se comportan bajo diferentes tratamientos.
- Realizar estas comparaciones con otros microorganismos para determinar si se encuentran los mismos resultados.
- Establecer modelos no isotérmicos para diferentes bacterias lácticas con base en los datos obtenidos en condiciones isotérmicas en esta investigación, comparar las simulaciones para las diferentes bacterias y validar los modelos propuestos con diferentes productos en condiciones reales con variación de temperatura.
- Resultaría importante utilizar los modelos propuestos en este trabajo para tratar de describir el crecimiento del *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* en otros productos lácteos, debido a que su utilidad como biopreservador sería importante en productos como quesos frescos o leche pasteurizada.
- Al momento de realizar estudios de esta naturaleza, se requiere de la integración de profesionales de las diferentes áreas involucradas (ingeniería, estadística, microbiología) en la microbiología predictiva, para facilitar la interpretación y discusión de los resultados obtenidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adair, C., Kilsby, D. y Whittall, P. (1989). *Comparison of the Schoolfield (non-linear Arrhenius) model and the square root model for predicting bacterial growth in foods*. Food Microbiol., v.6, p.7-18.
- Alais, C. (1985). *Ciencia de la leche*. Principios de tecnología lechera. Barcelona, Reverte, S.A. p.852.
- Augustin, J.C. y Carlier, V. (2000). *Mathematical modelling of the growth rate and lag time for Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol, v.56, p.29-51.
- Bachmann, H. y Spahr, U. (1995). *The fate of potentially pathogenic bacteria in Swiss hard and semihard cheese from raw milk*. Journal of Dairy Science, v.78, p.476-483.
- Bahadori, A. y Vuthaluru, H.B. (2010). *Simple Arrheniustype function accurately predicts dissolved oxygen saturation concentration in aquatic systems*. Process and, v.88, p.335-340.
- Baird-Parker, A.C. y Kilsby, D.C. (1987). *Principles of predictive food microbiology*. J. Appl. Microbiol. Symposium supplement, p. 435-439.
- Baranyi, J. y Roberts, T.A. (1994). *Un enfoque dinámico para predecir el crecimiento de bacterias en los alimentos*. Int J. Food Microbiol, v.23, p. 277-294.
- Baty, F. y Delignette-Muller, M.L. (2004). *Estimating the bacterial lag time: which model, which precision?* International Journal of Food Microbiology, v. 91, p. 261-277.
- Begot, C., Desnier, I., Daudin, J.D., Labadie, J.C. y Lebert, A. (1996). *Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements*. J. Microbiol. Methods, v.25, p. 225-232.

- Cayré, M.E., Vignolo, G. y Garro, O. (2003). *Modeling lactic acid bacteria growth in Vacuum-packaged cooked meat emulsion stored at three temperatures*. Food Microbiology, v.20, p. 561-566.
- Cayré, M.E., Vignolo, G. y GARRO, O. (2004). *Modelo dinámico para el crecimiento de bacterias lácticas sobre emulsiones cárnicas*. Comunicaciones Tecnológicas. Resumen: E072, Universidad Nacional del Nordeste.
- Cabeza, A. E. (2011). *Fundamentos de Microbiología Predictiva: aplicaciones teóricas y prácticas*. 1ra edición. Pamplona-Colombia: Universidad de Pamplona.
- Corradini, M.G., Amézquita, A., Normand, M.D. y Peleg, M. (2006). *Modeling and predicting non isothermal microbial growth using general purpose software*. v.1, p. 187-200.
- Corradini, M.G., y Peleg, M. (2005). *Estimating non isothermal bacterial growth in foods from isothermal experiments data*. v.99, p. 187-200.
- Covenin, A. (2000). *Norma Venezolana N° 1813*. Norma general de quesos (2da revisión). Fondonorma. Caracas, Venezuela.
- Dalcalton, F., (2010). *“Modelagem Matemática do Crescimento de Bacterias Acido Lácticas em Condições Isotérmicas e não Isotérmicas”* Tesis Universidad Federal De Santa Catarina, Florianopolis, Brasil.
- Dalgaard, P. y Jorgensen, L.V. (1998). *Predicción del crecimiento de Listeria Monocytogenes en las pruebas de provocación de marisco y salmón ahumado en frío contaminada de manera natural*. Revista Internacional de Microbiología de Alimentos v.40, p.105-115.
- Dalgaard, P., Mejlholm, O., y Huss, H.H. (1997). *Application of an iterative approach for development of a microbial model predicting the shelf-life of packed fish*. Int. J. FoodMicrobiol.v.38, p.169-179.

- Davey, K.R. (1992). *A terminology for models in predictive microbiology*. Food Microbiol. v.9, p. 353-356.
- Davies, K.W. (1993). *Design of experiments for predictive microbial modelling*. J. Ind. Microbiol. v.12, p. 295-300.
- Devlieghere, F., Geeraerd, A.H., Versyck, K.J., Van De Waetere, B., Van Impe, J. y Devere, J. (2001). *Growth of Listeria monocytogenes in modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model*. Food Microbiol. v.18, p. 53-66.
- Duffy, L.L., Vanderline, P.B., y Grau, F. H. (1994). *Growth of Listeria Monocytogenes on vacuum-packed cooked meats: effects of pH, aw, nitrite and ascorbate*. Int. J. Food Microbiol. v.23, p. 377-390.
- Farber, J., Pierson, M.D. y Stern, N.J. (1986). *Predictive modelling of food deterioration and safety*. In: (Eds.), Food-borne microorganisms and their toxins: Development Methodology. Marcel Dekker, New York, p.57-90.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. y Sweeney, P.L.H. (2000). *Fundamentals of cheese science*. Mariland: Aspen publication, p.587.
- Fontan, M.C.G., Franco, I., Prieto, B., Tornadijo, M.E. y Carballo, J. (2001). *Microbiological changes in 'San Simón' cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters*. Food Microbiology. v.18, n.1, p. 25-33.
- Fujikawa, H., Kai. A. y Morozumi, S., (2004). *A new logistic model for Escherichia coli growth at constant and dynamic temperatures*. Food, v.21, p.501-509.
- Gaya, P., Medina, M. y Nuñez, M. (1986). *Mejora de la calidad higiénica sanitaria del queso Manchego mediante la optimización de los parámetros de elaboración*. Revista Española de Lechería, v.8, p. 31-35.

- Geeraerd, A., Herremans, C., Cenens, C. y Van Impe, J. (1998). *Applications of artificial neural networks as a non-linear modular modeling technique to describe bacterial growth in chilled food products*. Int. J. Food Microbiol., v.44, p. 49-68.
- Giannuzzi, L., Pinotti, A. y Zaritzky, N. (1998). *Mathematical modeling of microbial Growth in pack aged refrigerated beef at different temperature* International Food, v.39, p. 101-110.
- Gibson, C.W.D., Watt, T.A. y Brown, V.K. (1987). *The use of sheep grazing to recreate species-rich grassland from abandoned arable land*. Biol. Conser v.42, p.165-183.
- Gil, M.M., Brandão, T.R.S. y Silva, C.L.M. (2006). *A Modified Gompertz model to predict microbial inactivation under time varying temperature conditions*. Journal Food, v.76, p. 89-94.
- Grau, F.H. y Vanderline, P.B. (1993). *Aerobic growth of Listeria monocytogenes on beef lean and fatty tissue: equations describing the effects of temperature and pH*. J. Food Prot., v.56, p.96-101.
- Hassan, A.N. y Frank, J.F. (2001). *Starter cultures and their use*. In: marth, e. h.; steele, j. l. (Ed.). Applied Dairy Microbiology. 2da Ed. New York: Marcel Decker.
- Hudson, J.A. (1993). *Effect of preincubation temperature on the lag time of Aeromonas hydrophila*. Lett. Applied Microbiology. v.16, p.274-276.
- Indecopi. (2004). *Leche y productos lácteos: Quesos, identificación, clasificación y requisitos*. Norma Técnica Peruana NTP 202.194. Lima – Perú.
- Juneja, V.K. y Marks, H.M. (1999). *Proteolytic Clostridium Botulinum Growth at 12-48 °C simulating the cooling of cooked meat: development of a predictive model*. Food Microbiology, v.16, p.583-592.

- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. y Reuter, G. (1998). *Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria*. International Journal of Food Microbiology, v.41, p. 103-125.
- Klin, N., Weerkamp, A. H., De Vos, W.M. (1995). *Detection and characterization of lactose-utilizing Lactococcus spp. in natural ecosystems*. Applied and Environmental Microbiology, v. 61, p. 788-792.
- Koutsoumanis, K. y Nychas, G.J.E. (2000). *Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf life predictions*. International Journal, v.60, p.171-184.
- Labaide, J. (1999). *Consequences of packaging on bacterial growth: meat is an ecological niche*. Meat Science, v.52, p.299-305.
- Labuza, T.P. y Fu, B. (1993). *Growth kinetics for shelflife prediction: theory and practice*. Journal, v.12, p.309-323.
- López, T. M., Alonso, C., Román, C., García-López, M. L., Moreno, B. (2000). *Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese*. Food Microbiology, London, v.17, n.1, p.23-32.
- Madigan, M. T., Martinko, J.M., y Parker, J. B. (1997). *Biología de los Microorganismos*. Ed. Prentice Hall Iberia. 8ª Ed. Revisada, Inc. p. 149-177.
- Massager, P. R., (2005). *Microbiología*. Editora Varela, São Paulo, SP, Brasil.
- Mataragas, M., Drosinos, E.H., Vaidanis, A. y Metaxopoulos, I. (2006). *Desarrollo de un modelo predictivo del deterioro de los productos cocinados cárnicos curados y su validación en condiciones de almacenamiento a temperatura constante y dinámico*. J Food Sci. v.71, p.157-167.
- McDonald, K. y Sun, D.W. (1999). *Predictive food microbiology for the meat industry: a review*. International, v.52, p.1-27.

- Mckellar, R.C. y Lu, X. (2004). *Modeling. CRC series in contemporary food science*. CRCPRESS Boca Raton, London, NewYork, Washington, D.C.
- Mcmeekin, T.A. y Ross, T. (1996). *Predicción de la vida útil: estado y las posibilidades futuras*. *Int. J. Food. Microbiol* v.33, p.65-83.
- Mcmeekin, T.A., Olley, J.N., Ross, T. y Ratkowsky, D.A. (1993). in: *Predictive microbiology: theory and applicaction*. Research studies press Ltd., John Wiley and Sons, New York.
- Mcmeekin, T.A., Baranyi, J., Bowman, J., Dalgaard, P., Kirk, M. Ross, T. y Zwietering, S. (2006). *Sistemas de información en gestión de la seguridad alimentaria*. *Int. J. Food. Microbiol* v.112, p.181-194.
- Mcmeekin, T.A., Olley, J. y Ratkowsky, D.A. (1988). *Efectos de la temperatura sobre las tasas de crecimiento bacteriano*. En: Bazin, MJ y Prosser, JI (Eds.) *Modelos fisiológicos en Microbiología*, p.75-89. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.
- Nakashima, S.M.K., André, C.D.S. y Franco, B.D.G.M. (2000). *Revisão: Aspectos Básicos da Microbiología Preditiva*. *Brazilian*, v.3, p.41-51.
- Neumeyer, K., Ross, T., Thomson, G. y Mcmeekin, T.A. (1997). *Validación de un modelo que describe el efecto de la temperatura y la actividad del agua en el crecimiento de Pseudomonas psychrotrophic*. *Int.. J. Food. Microbiol* v.38, p.55-63.
- Oria, R. (1996). *Elaboración de Productos Lácteos*. Editorial Acribia, Zaragoza España.
- Peleg, M. (2006). *Advanced quantitative microbiology for food and biosystems: models for predicting growth and inactivation*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Perni, S.; Andrew, P.W. y Shama, G. (2005). *Estimating the maximum growth curves: definition is everything*. *Food Microbiology*, v.22, p.491-495.

- Phua, S.T.G. y Davey, K.R. (2007). *Predictive modeling of high pressure ($\leq 700\text{Mpa}$) cold pasteurization ($\leq 25^\circ\text{C}$) of Escherichia coli, Yersinia enterocolitica and Listeria monocytogenes in three liquid foods*. Chemical Engineering and Processing, v.46, p.458-464.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. y Klein, D.A. (1999). *Microbiología*. 4ta ed. p 526-529. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid.
- Ratkowsky, D.A., Olley, J., Mcmeekin, T.A., Ball, A. (1982). *Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures*, Journal, v.149, p.15.
- Ray, B., y Bhunia, A. (2010). *Fundamentos de Microbiología de los Alimentos*. 4ª. Ed. Mc Graw Hill. México, D.F. v.4, p.150.
- Roberts, T.A., y Jarvis, B. (1994). *Predictive modelling of food safety with particular*.
- Robins, M., Brocklehurst, T. y Wilson, P. (1994) *Food structure and the growth of pathogenic bacteria*. Food Technology International Europe, p.31-36.
- Robinson, T. P., Ocio, M. J., Kaloti, A. y Mackey, B. M. (1998). *The effect of growth environment on the lag phase of Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology v.44, p.83-92.
- Ross, T. (1996). *Índices de evaluación del desempeño de los modelos predictivos en microbiología de los alimentos*. Journal Appl Microbiol v.81, p.501-508.
- Sarmiento, C. M., (2006). *Modelagem do Crescimento Microbiano*. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brasil.
- Skinner, G.E., Larkin, J.W. y Rhodehamel, E.J. (1994). *Mathematical modelling of bacterial growth*. J. Food Safety, v.14, p.175-217.

- Slongo, A.P., Rosenthal. A., Camargo, L.M.Q., Deliza, R., Mathias, S.P. y Aragón, G.M.F. (2009). *Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure*. Food Science Technology v.42, p.303-306.
- Smith-Simpson, S., Corradini, M.G., Normand, M.D., Peleg, M. y Schaffner, D.W. (2007). *Estimating microbial growth parameters from non isothermal data: A case study with Clostridium perfringens*. International Microbiology, v.118, p.294-303.
- Sutherland, J. P., Bayliss, A. J. y Roberts, T. A. (1994). *Predictive modelling of growth of Staphylococcus aureus: the effects of temperature, pH and sodium chloride*. Int. J. Food Microbiol., v.21, p.217-236.
- Swinnen, J.F.M. (2005). *When the market comes to you - or not. The dynamics of vertical co-ordination in agro-food chains in Europe and Central Asia*. World Bank: Washington, D.C.
- Teuber, M. (1995). *The genus Lactococcus*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. (Ed.). The genera of lactic acid bacteria. London: Chapman y Hall. v. 2.
- Valbuena, E., Castro, G., Sánchez, E., Briñez, W., Vera, H. y Leal, M. (2008). *Comparación de modelos sigmoidales aplicados al crecimiento de Lactococcus lactis subsp. lactis*. Revista Científica FCV-LUZ. XVIII: p. 582-588.
- Van Impe, J.F., Nicolai, B.M., Martens, T., Baerdemaeker, J. y Vandewalle, J. (1992). *Dynamic Mathematical Model to predict microbial growth and Inactivation during food processing*. Applied, v.58, p.2901-2909.
- Van Impe, J.F., Bart, M.N., Schellekens, M.; Martens, T. y Baerdemaeker, J.A. (1995). *Predictive microbiology in a dynamic environment: a system the ory approach*. International, v.25, p.227-249.

- Whiting, R.C. (1995). *Microbiological modeling*. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v.35, p.467-494.
- Whiting, R.C. (1992). *Letters to the editor: notes on reparametrization of bacterial growth curves-a reply to J. Baranyi and W.E. Barthright*. Food Microbiol. v.9, p.173-174.
- Whiting, R.C., y Buchanan, R.L. (1993). *A classification of models in predictive microbiology ear eply to K.R.Davey*. Food, v.10, p.175-177.
- Whiting, R.C., y Buchanan, R.L. (1994). *Microbial modelling*. Food Technol. v.48, p.113-120,
- Yates, G.T. y Smoter, T. (2007). *On the lag phase and initial decline of micrtobial growth curves*. Journal of Ttheoretical Biology, v. 244, p. 511-517.
- Zarate, S.P., (2009) *Aplicación del modelo cinético de gompertz a la interacción del efecto de la temperatura sobre el crecimiento de lactococcus lactis subsp. lactis en leche*. Artículo científico; Universidad Nacional de Callao, ciencia y tecnología v.13.
- Zwietering, M.H., De Koos, J.T., Hasenack, B.E., De Wit, J.C. y Van't Riet, K. (1991). *Modeling of bacterial growth as a function of temperature*. Appl. Environ. Microbiol. v.57, p.1094-1101.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M. y Van't Riet, K. (1990). *Modeling of the bacterial growth curve*. Appl. Environ. Microbiol. v.56, p.1875-1881.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza para Log (ufc/ml) en función al tiempo y temperatura

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P | significancia |
|-----------------------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|---------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | | |
| A: tiempo | 41.2843 | 5 | 8.25686 | 246.77 | 0.0000 | ** |
| B: temperatura | 1.35911 | 2 | 0.679557 | 20.31 | 0.0000 | ** |
| INTERACCIONES | | | | | | |
| AB | 0.818463 | 10 | 0.0818463 | 2.45 | 0.0241 | * |
| RESIDUOS | 1.20453 | 36 | 0.0334593 | | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 44.6664 | 53 | | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Anexo 2. Predicción del de crecimiento del *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. cremoris* en condiciones isotérmicas a diferentes temperaturas a través del modelo de Gompertz cada 6 horas.

| Tiempo (horas) | Log (ufc/ml) | | |
|----------------|--------------|------------|------------|
| | 9°C | 12°C | 15°C |
| 0 | 5.80291613 | 5.80291613 | 5.83167009 |
| 6 | 5.820556 | 5.820556 | 5.86732818 |
| 12 | 5.85246347 | 5.85246347 | 5.94980867 |
| 18 | 5.90310494 | 5.90310494 | 6.09332425 |
| 24 | 5.97518161 | 5.97518161 | 6.29485785 |
| 30 | 6.06886519 | 6.06886519 | 6.53579302 |
| 36 | 6.18177047 | 6.18177047 | 6.79112152 |
| 42 | 6.3095482 | 6.3095482 | 7.03838155 |
| 48 | 6.4467873 | 6.4467873 | 7.26224331 |
| 54 | 6.58791353 | 6.58791353 | 7.45499724 |
| 60 | 6.72788194 | 6.72788194 | 7.61487033 |
| 66 | 6.86259068 | 6.86259068 | 7.74382618 |
| 72 | 6.98903822 | 6.98903822 | 7.8457068 |
| 78 | 7.10529227 | 7.10529227 | 7.92496261 |
| 84 | 7.2103466 | 7.2103466 | 7.98591292 |
| 90 | 7.30392935 | 7.30392935 | 8.03238628 |
| 96 | 7.38630659 | 7.38630659 | 8.06759636 |
| 102 | 7.4581065 | 7.4581065 | 8.09414684 |
| 108 | 7.52017529 | 7.52017529 | 8.11409706 |
| 114 | 7.57346702 | 7.57346702 | 8.12904854 |
| 120 | 7.61896431 | 7.61896431 | 8.14023195 |
| 126 | 7.65762481 | 7.65762481 | 8.14858479 |
| 132 | 7.69034776 | 7.69034776 | 8.15481677 |
| 138 | 7.7179553 | 7.7179553 | 8.15946265 |

Anexo 3. Ajuste de la curva de crecimiento con diferentes modelos primarios

Figura 11. Modelo de Gompertz modificado a Temperatura de 9°C

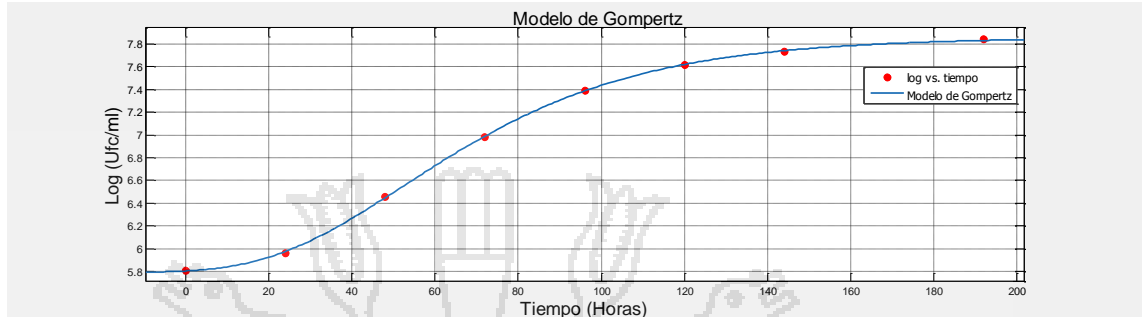


Figura 12. Modelo Logístico a Temperatura de 9°C

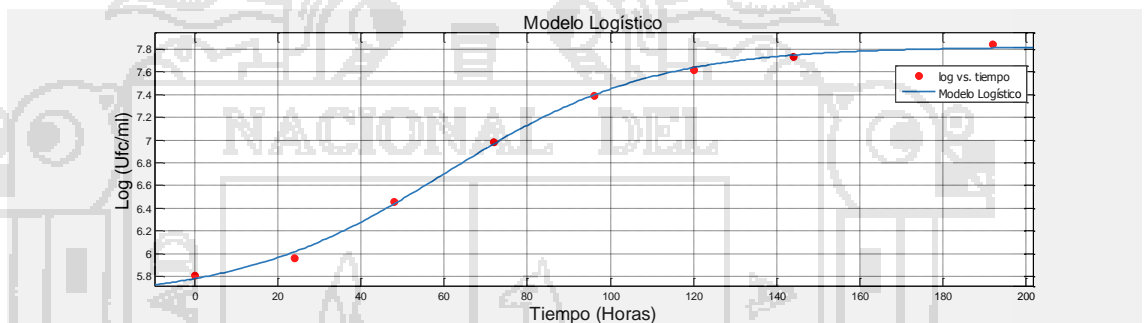


Figura 13. Modelo Logístico Modificado a Temperatura de 9°C

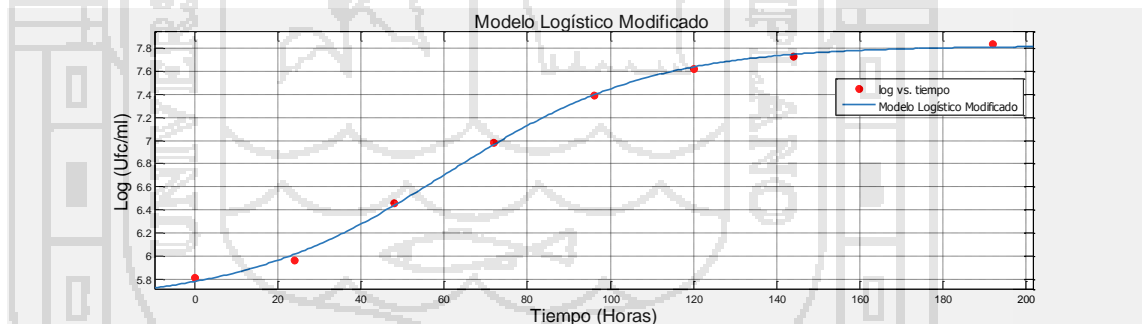


Figura 14. Modelo de Baranyi y Roberts a Temperatura de 9°C

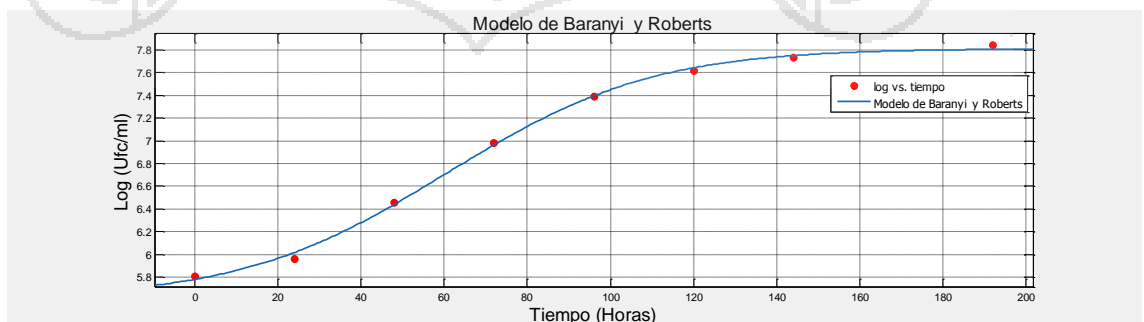


Figura 15. Modelo de Gompertz modificado a Temperatura de 12°C

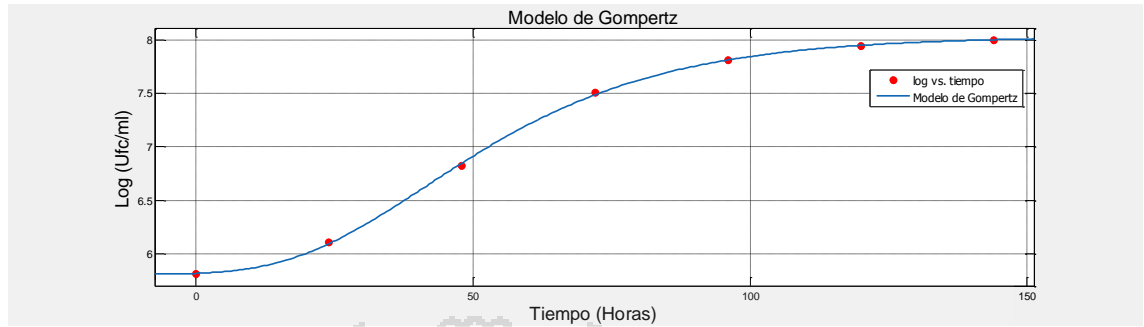


Figura 16. Modelo Logístico a Temperatura de 12°C

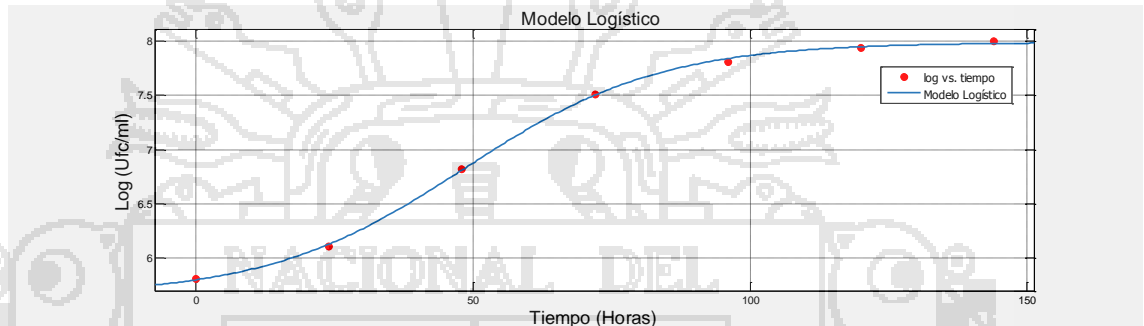


Figura 17. Modelo Logístico Modificado a Temperatura de 12°C

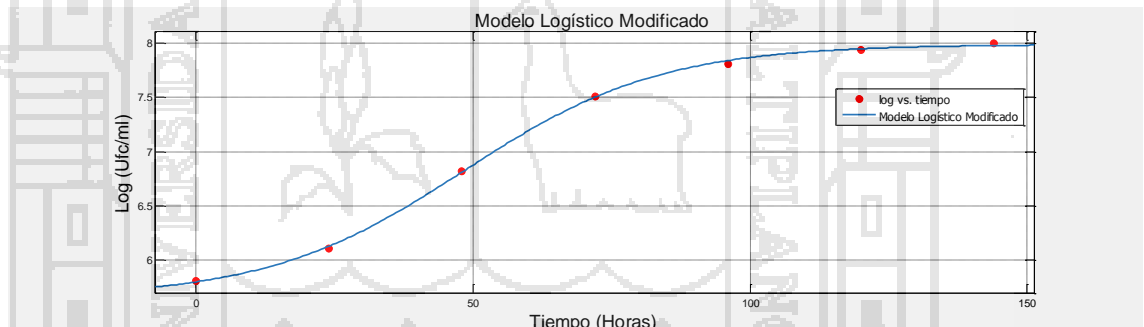


Figura 18. Modelo de Baranyi y Roberts a Temperatura de 12°C

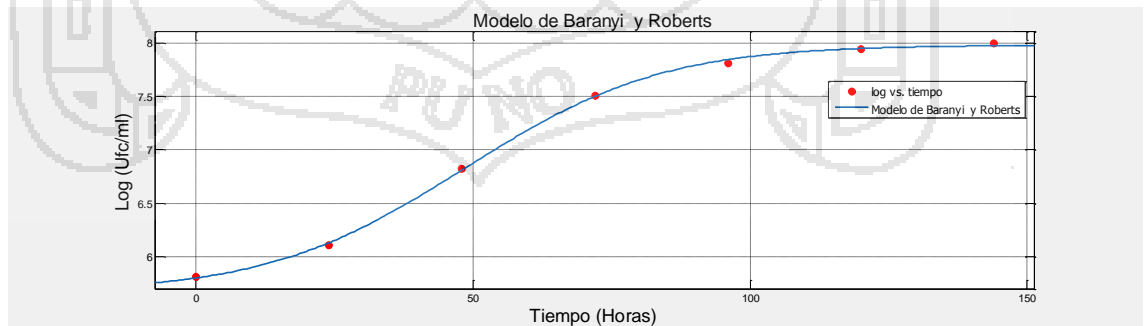


Figura 19. Modelo de Gompertz modificado a Temperatura de 15°C

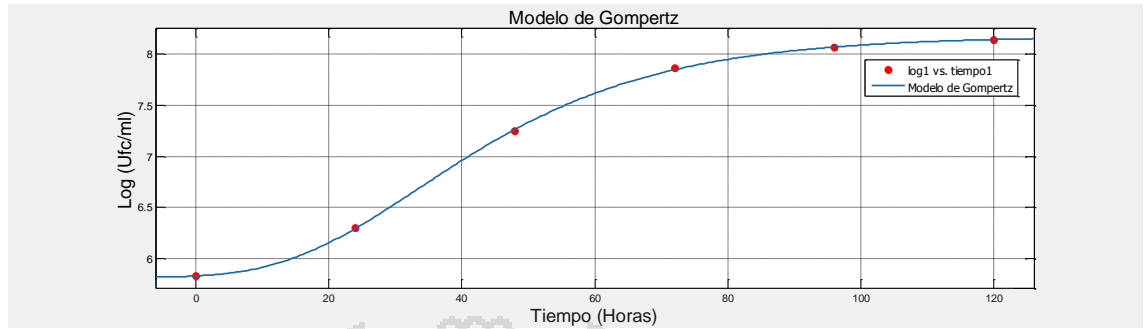


Figura 20. Modelo Logístico a Temperatura de 15°C

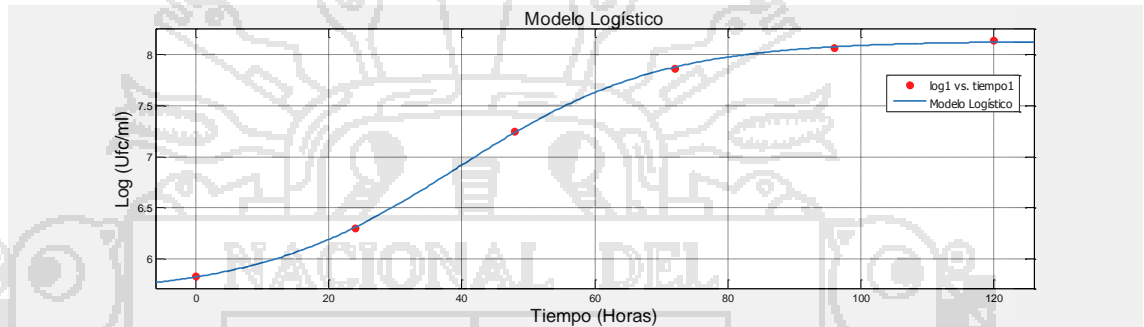


Figura 21. Modelo Logístico Modificado a Temperatura de 15°C

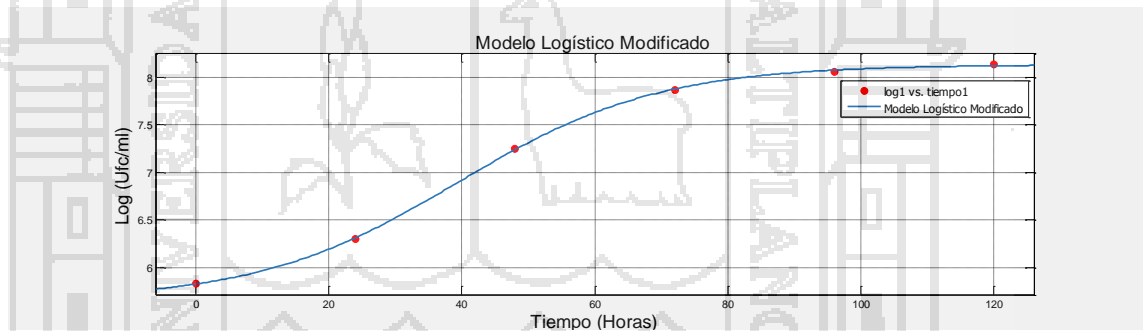
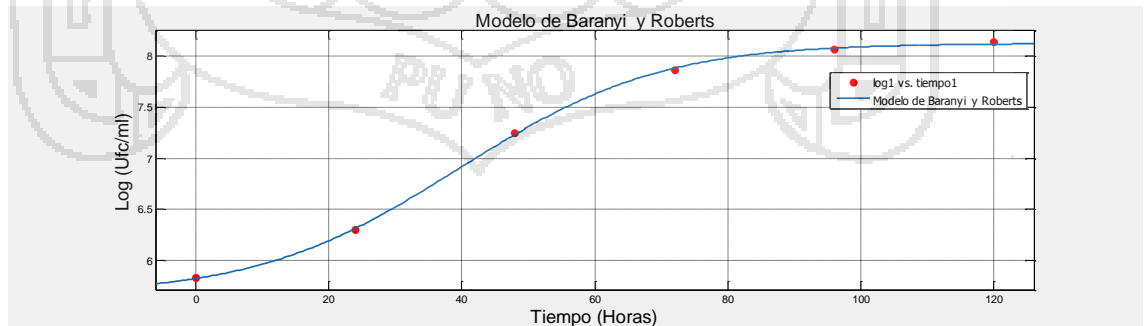


Figura 22. Modelo de Baranyi y Roberts a Temperatura de 15°C



Anexo 4. Parámetros ajustados por diferentes modelos primarios

| Modelos primarios | Temperatura | N ₀ | B | A | M | R ² | R ² ajustado | RMSE |
|-----------------------------|-------------|----------------|---------|-------|-------|----------------|-------------------------|---------|
| GOMPERTZ MODIFICADO | 9°C | 5.79 | 0.03098 | 2.069 | 52.44 | 0.9998 | 0.9996 | 0.0152 |
| | 12 °C | 5.808 | 0.04135 | 2.224 | 41.43 | 0.9997 | 0.9997 | 0.0239 |
| | 15 °C | 5.819 | 0.04934 | 2.354 | 33.51 | 0.9999 | 0.9997 | 0.016 |
| LOGISTICO | 9°C | 5.6 | 0.04035 | 2.222 | 60.4 | 0.9985 | 0.9996 | 0.0152 |
| | 12 °C | 5.657 | 0.05641 | 2.329 | 48.37 | 0.9996 | 0.9993 | 0.0239 |
| | 15 °C | 5.657 | 0.06636 | 2.474 | 39.43 | 0.9998 | 0.9997 | 0.01683 |
| LOGÍSTICO MODIFICADO | 9°C | 5.779 | 0.0405 | 2.218 | 60.43 | 0.9986 | 0.9974 | 0.04142 |
| | 12 °C | 5.8 | 0.05641 | 2.329 | 48.37 | 0.9996 | 0.9992 | 0.02581 |
| | 15 °C | 5.825 | 0.06636 | 2.474 | 39.43 | 0.9998 | 0.9995 | 0.02244 |
| BARANYI Y ROBERTS | 9°C | 5.779 | 0.04434 | 2.035 | - | 0.9983 | 0.9975 | 0.03995 |
| | 12 °C | 5.8 | 0.06226 | 2.18 | - | 0.9995 | 0.9992 | 0.02581 |
| | 15 °C | 5.824 | 0.07415 | 2.298 | - | 0.9996 | 0.9995 | 0.02244 |

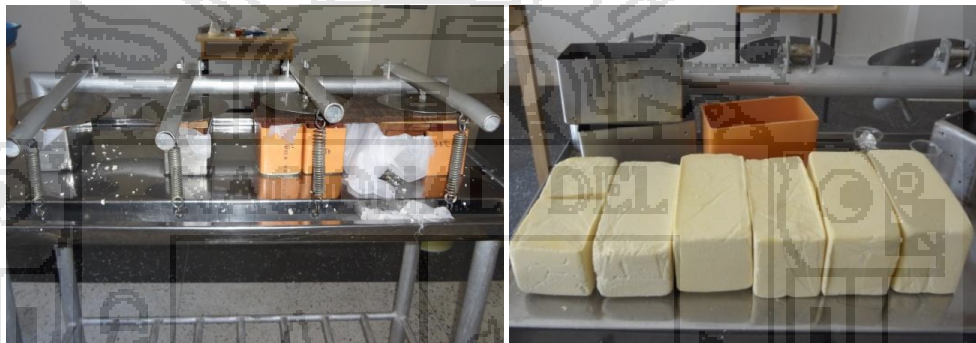
Anexo 5. Valores de los índices definidos para el perfil de temperatura de 9-15°C

| Perfil/ parámetro | INDICES | | | | | | | |
|----------------------|---------|--------|---------|--------|--------|----------|---------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 9-12°C | | | | | | | | |
| a | 5.9931 | 3.7116 | -8.1286 | 0.3758 | 4.1713 | -15.3391 | 14.1367 | -14.4319 |
| b | 4.6642 | 4.7937 | 4.642 | 9.6409 | 0.6057 | 5.4999 | 4.976 | 5.7725 |

Anexo 6. Panel fotográfico en la elaboración del queso tipo paria



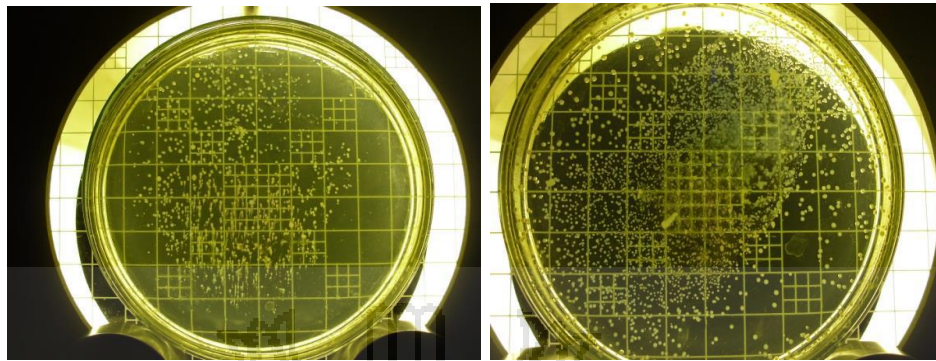
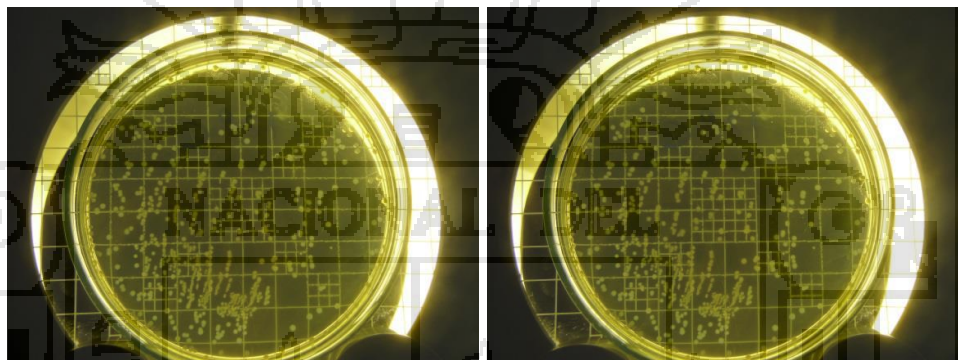
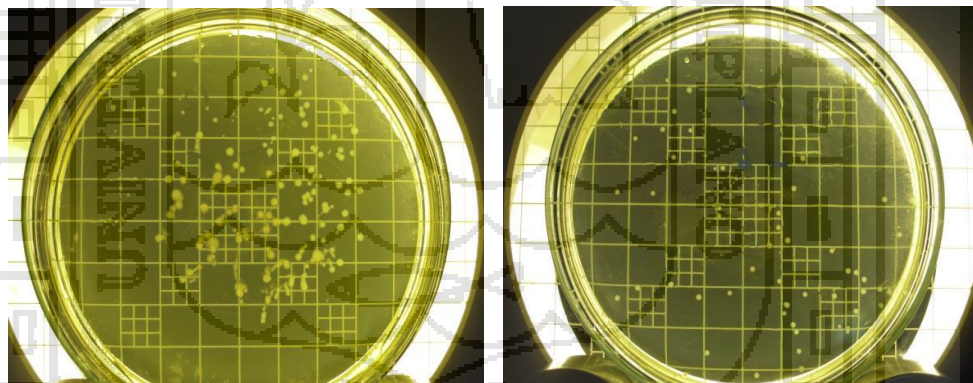
Fotografía 1 y 2 proceso de elaboración.



Fotografía 3 y 4 obtención del queso tipo paria.



Fotografías 5, 6 y 7 cámaras de maduración del queso acondicionadas

Anexo 7. Panel fotográfico del análisis microbiológicoFotografías 8 y 9 crecimiento con una dilución de 10^{-4} Fotografías 10 y 11 crecimiento con una dilución de 10^{-5} Fotografías 12 y 13 crecimiento con una dilución de 10^{-6}

Anexo 8. Ficha técnica del cultivo láctico

CHR HANSEN

FD-DVS R-707 pHage Control™

Product Information

Version: 2 PI-EU-EN 01-21-2008

| | | | | | | | |
|----------------------------|---|---------------------|--|--------------|-----------|---------|------------------|
| Description | Mesophilic homofermentative culture, type O. This Chr. Hansen culture range provides phage resistant defined strains for continuous Direct Vat Set (DVS) use. This culture contains specially selected strains chosen for their phage resistance and ability to produce lactic acid quickly. This culture does not produce CO ₂ . | | | | | | |
| Taxonomy | Lactococcus lactis subsp. lactis Lactococcus lactis subsp. cremoris | | | | | | |
| Packaging | <table border="0"> <tr> <td>Material No:</td> <td>Size</td> <td>Type</td> </tr> <tr> <td>100097</td> <td>10X50 U</td> <td>Pouch(es) in box</td> </tr> </table> | Material No: | Size | Type | 100097 | 10X50 U | Pouch(es) in box |
| Material No: | Size | Type | | | | | |
| 100097 | 10X50 U | Pouch(es) in box | | | | | |
| Physical Properties | <table border="0"> <tr> <td>Color:</td> <td>Off-white to slightly reddish or brown</td> </tr> <tr> <td>Form:</td> <td>Granulate</td> </tr> </table> | Color: | Off-white to slightly reddish or brown | Form: | Granulate | | |
| Color: | Off-white to slightly reddish or brown | | | | | | |
| Form: | Granulate | | | | | | |
| Application | <p>Usage The culture is primarily applied in the production of cheeses with a closed texture, e.g. Cheddar, Feta and Cottage cheese. The culture can be applied in other fermented dairy products, in combination or not with other lactic cultures.</p> <p>Suggested dosage As a principal rule 1000 U of freeze-dried DVS cultures will correspond to 100 l of active bulk starter. However, specific usage rates should be determined experimentally before a new application.</p> | | | | | | |

www.chr-hansen.com

Page: 1 (4)

The information contained herein is to the best of our knowledge true and correct and presented in good faith. It may be subject to change without further notice. To the best of our knowledge this product does not infringe Intellectual Property Rights of any third party. This information is offered solely for your consideration and verification. Copyright© Chr. Hansen A/S. All rights reserved.



FD-DVS R-707 pHage Control™

Product Information

Version: 2 PI-EU-EN 01-21-2008



Recommended inoculation rate

| | | | | | | | |
|---|-------|-------|--------|---------|---------|---------|---------|
| Amount of milk to be inoculated (in liters) | 500 | 2,000 | 5,000 | 10,000 | 15,000 | 20,000 | 25,000 |
| Amount of DVS culture | 50 U | 200 U | 500 U | 1,000 U | 1,500 U | 2,000 U | 2,500 U |
| Amount of milk to be inoculated (in lbs) | 1,140 | 4,500 | 11,350 | 22,700 | 34,000 | 45,500 | 57,000 |
| Amount of DVS culture | 50 U | 200 U | 500 U | 1,000 U | 1,500 U | 2,000 U | 2,500 U |

Directions for Use

Remove cultures from the freezer just prior to use. **Do not thaw** Sanitize the top of the pouch with chlorine. Open the pouch and pour the freeze-dried granules directly into the pasteurized product using slow agitation. Agitate the mixture for 10-15 minutes to distribute the culture evenly. The recommended incubation temperature is dependent on the application in which the culture is used. For more information on specific applications see our technical brochures and suggested recipes.

Range

Cultures in this series include R-703, R-704, R-707 and R-708 (freeze-dried) and R-603, R-604, R-607 and R-608 (frozen).

Storage and handling

< -18 °C / < 0 °F.

Shelf life

At least 24 months from date of manufacture when stored according to recommendations.
At +5°C (41°F) the shelf life is at least 6 weeks.

www.chr-hansen.com

Page: 2 (4)

The information contained herein is to the best of our knowledge true and correct and presented in good faith. It may be subject to change without further notice. To the best of our knowledge this product does not infringe Intellectual Property Rights of any third party. This information is offered solely for your consideration and verification. Copyright© Chr. Hansen A/S. All rights reserved.

FD-DVS R-707 pHage Control™

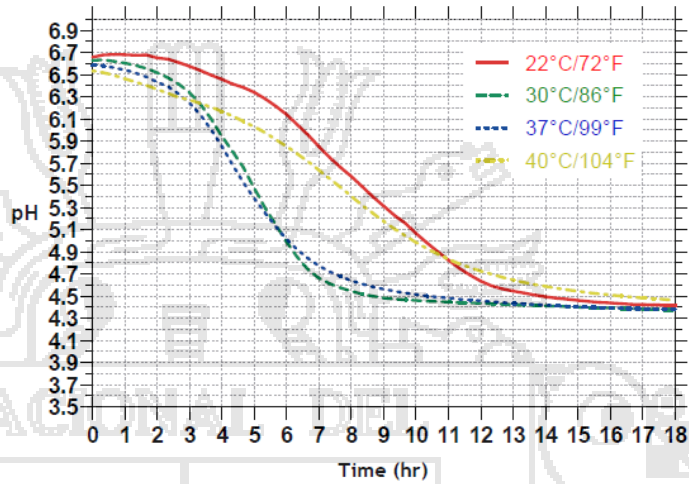
Product Information

Version: 2 PI-EU-EN 01-21-2008



Technical Data

Acidification curve



Fermentation conditions:
 Lab milk 9.5 % T.S.: 140°C/8 seconds - 100°C/30 minutes
 Inoculation: 500U/5000L

Analytical Methods

References and analytical methods are available upon request.

Other Information

- Salt sensitivity:
- 50% inhibition: 5.3% NaCl.
 - 100% inhibition: >5.8% NaCl.

Legislation

Chr. Hansen's cultures comply with the general requirements on food safety laid down in Regulation 178/2002/EC. Lactic acid bacteria are generally recognized as safe and can be used in food, however, for specific applications we recommend to consult national legislation.

The product is intended for use in food.

www.chr-hansen.com

Page: 3 (4)

The information contained herein is to the best of our knowledge true and correct and presented in good faith. It may be subject to change without further notice. To the best of our knowledge this product does not infringe Intellectual Property Rights of any third party. This information is offered solely for your consideration and verification. Copyright© Chr. Hansen A/S. All rights reserved.

FD-DVS R-707 pHage Control™

Product Information

Version: 2 PI-EU-EN 01-21-2008

CHR HANSEN

| | |
|--------------------------|---|
| Food Safety | No guarantee of food safety is implied or inferred should this product be used in applications other than those stated in the Usage section. Should you wish to use this product in another application, please contact your Chr. Hansen representative for assistance. |
| Ingredients | Available upon request. |
| Labeling | Suggested labeling "lactic acid culture" or "starter culture", however, as legislation may vary, please consult national legislation. |
| Trademarks | Trademarks appearing in this document might not be registered in your country, even if they are marked with an ©. Trademarks are owned by Chr. Hansen or used under license. |
| Dietary status | Kosher: Kosher Dairy Excl. Passover |
| Technical support | Chr. Hansen's Application and Product Development Laboratories and personnel are available if you need further information. |

