

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FRANCIELI DALCANTON

**MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO
LÁCTICAS EM CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS E NÃO ISOTÉRMICAS**

Florianópolis, outubro de 2010

FRANCIELI DALCANTON

**MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO
LÁCTICAS EM CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS E NÃO ISOTÉRMICAS**

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Gláucia Maria Falcão de Aragão

Co-orientador: Prof. Dr. João Borges Laurindo

Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Rosa María García-Gimeno

Florianópolis, outubro de 2010

"Nós devemos ser a mudança que
desejamos para o mundo."
Gandhi

"Transportai um punhado de terra todos
os dias e fareis uma montanha."
Confúcio

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir concretizar mais um sonho e dar mais um passo em minha caminhada.

À minha orientadora Gláucia, pela amizade e grande contribuição nesta etapa da minha formação. Seus ensinamentos, dedicação e presença constante foram fundamentais neste trabalho, seu exemplo de pessoa e profissional é admirado por todos seus alunos. Muito obrigada por todo apoio, confiança e por fazer parte desta etapa da minha vida!

Ao meu co-orientador João, pelas fundamentais contribuições, críticas, sugestões e correções para a melhoria deste trabalho. Muito obrigada!

À minha co-orientadora Rosa María, que me abriu as portas da Universidade de Córdoba e me forneceu todo apoio necessário para a realização deste trabalho. Agradeço também ao professor Gonçalo, por me receber no departamento e pelas palavras de apoio e carinho.

À professora Cleonice, pela contribuição fundamental no início deste trabalho, esclarecendo dúvidas ao longo de todo o doutorado, por estar sempre disposta a me ajudar e por também fazer parte da defesa desta tese.

Ao professor Bruno, por me ajudar nas primeiras modelagens há “alguns” anos, pelo apoio ao longo deste caminho, pela amizade e por participar da defesa.

Aos professores Agenor, Bernadette e Petrus, por aceitarem participar da defesa desta tese, enriquecendo este trabalho.

À minha mãe, Maria Gessi, pelo exemplo de vida, amor, bondade, esforço e apoio incondicional para minha formação. Obrigada por estar sempre presente ao meu lado apesar da distância, e por toda a força enquanto estive na Espanha e por sempre acreditar em mim e me apoiar em todas as decisões. Amo você!

Aos meus irmãos, Sidnei e Rodrigo, as minhas cunhadas Tide e Dani, e aos meus amores-sobrinhos, Luiz Henrique, Luiza, João Luiz e Maria Júlia, por estarem sempre presentes apesar da distância, pelo apoio, por acreditarem e apoiarem meus estudos. Obrigada pelo carinho e amor! Amo vocês!

Ao meu namorado Francisco, por todo carinho, companheirismo, apoio, paciência e ajuda fundamental em todos os momentos, tanto na parte escrita, quanto na força e incentivo constantes. Obrigada também pelo carinho da sua família. Amo você!

Aos bolsistas Silmara, Mariana e Felipe, por terem contribuído na realização dos experimentos, pela dedicação e disponibilidade nas madrugadas e finais de semana.

Ao Cristiano, sempre disposto a ajudar, obrigada por toda contribuição “matemática” ao longo de todo o doutorado.

Ao projeto PHB, especialmente a Jaci, Jorge, Kelin, Andréa, Márcia e Murilo, por me ajudarem ao longo de todo o doutorado, além das análises, pela companhia nas tantas madrugadas. Muito obrigada a todos!

Aos amigos e colegas do ENGEBIO, especialmente as “Glaucetes”, por toda ajuda, compreensão, incentivo e amizade: Déia, Manu, Gisa, Ana Paula, Letícia, Mélodi, Morgana, Beatriz, Denise, Francielo, Américo, Sabrina, Anderson e Adriana.

Às minhas amigas Bianca, Franciny, Patty, Kelly, Blenda, Gabi, Marinês e Priscilla por todos os momentos compartilhados, apoio e carinho.

Aos colegas e amigos do laboratório da Espanha, por compartilharem momentos de alegria, pelo apoio e ajuda: Yanet, Elena, Fernando, Antonio, Juani, Rafa, Katy, Denisse, Rosa, Loli, Patty e a todos que participaram da análise sensorial. Muito obrigada!

As minhas amigas “estrangeiras” Paloma, Yanet e Patty, pela companhia, carinho e amizade fundamentais no estágio da Espanha. Agradeço também a Azahara, Diego e Mayte, pela amizade conquistada nos meses que dividimos a mesma casa. Agradeço também pelo carinho das suas famílias.

À UFSC e ao programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos pela oportunidade do desenvolvimento desta pesquisa.

À CAPES pelo apoio financeiro tanto no Brasil, quanto na Espanha, que foi fundamental para a execução deste trabalho.

À Universidade de Córdoba e ao Laboratório de Bromatologia e Tecnologia de Alimentos da Espanha por terem me recebido e financiado a pesquisa.

À todas as pessoas e situações que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, as quais, direta ou indiretamente, participaram da minha formação como profissional e ser humano, a minha eterna gratidão.

Este trabalho somente foi concretizado com a participação fundamental de cada um de vocês! Muito obrigada!

Fran.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Bactérias ácido lácticas	19
2.2 Deterioração em produtos cárneos	20
2.3 Importância dos fatores extrínsecos no crescimento microbiano	22
2.3.1 Temperatura	22
2.3.2 Conservantes químicos	23
2.3.3 pH	24
2.4 Microbiologia preditiva	25
2.4.1 Modelos matemáticos	26
2.5 Validação dos modelos	37
CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Modelagem matemática do crescimento de <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus viridescens</i> e <i>Lactobacillus sakei</i> em diferentes temperaturas de incubação	41
3.1.1 Micro-organismos e meio de cultivo	41
3.1.2 Condições de crescimento	41
3.1.3 Amostragem	42
3.1.4 Modelagem matemática das curvas de crescimento das BAL	42
3.1.5 Comparação estatística dos modelos	44
3.2 Modelagem matemática do crescimento de <i>Lactobacillus plantarum</i> sob condições não isotérmicas	45
3.2.1 Micro-organismo e meio de cultivo	45
3.2.2 Condições de crescimento	45
3.2.3 Amostragem	46
3.2.4 Modelagem matemática sob condições de temperaturas variáveis	46
3.2.5 Comparação estatística dos modelos	48
3.3 Modelagem dos efeitos combinados da temperatura, pH, cloreto de sódio e lactato de sódio na velocidade de crescimento de <i>Lactobacillus plantarum</i>	49
3.3.1 Micro-organismo e preparo do inóculo	49
3.3.2 Delineamento experimental e obtenção dos dados experimentais	49
3.3.3 Modelagem matemática da velocidade de crescimento de <i>L. plantarum</i>	54
3.3.4 Validação do modelo preditivo	57
3.3.5 Critérios de avaliação	57
3.4 Modelagem matemática do crescimento de <i>Lactobacillus plantarum</i> em <i>chopped</i> suíno cozido embalado a vácuo e armazenado em diferentes temperaturas	58
3.4.1 Amostras do produto cárneo	58
3.4.2 Análises microbiológicas e físico-químicas	59
3.4.3 Análise sensorial e determinação da vida de prateleira	60
3.4.4 Modelagem matemática do crescimento de <i>L. plantarum</i> no produto cárneo	61
3.4.5 Análises estatísticas	62
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	63

4.1 Modelagem matemática do crescimento de <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus viridescens</i> e <i>Lactobacillus sakei</i> em diferentes temperaturas de incubação.....	64
4.1.1 Artigo 1: Modeling of <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus viridescens</i> and <i>Lactobacillus sakei</i> growth at different temperatures.....	66
4.1.2 Informações complementares.....	83
4.1.3 Nomenclatura.....	91
4.2 Modelagem matemática do crescimento de <i>Lactobacillus plantarum</i> sob condições não isotérmicas.....	92
4.2.1 Artigo 2: Mathematical modeling of <i>Lactobacillus plantarum</i> growth under variable temperature conditions.....	92
4.2.2 Informações complementares.....	109
4.2.3 Nomenclatura.....	112
4.3 Modelagem dos efeitos combinados da temperatura, pH, cloreto de sódio e lactato de sódio na velocidade de crescimento de <i>Lactobacillus plantarum</i>	113
4.3.1 Artigo 3: Modeling the combined effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium lactate concentrations on <i>Lactobacillus plantarum</i> growth rate.....	113
4.3.2 Informações complementares.....	134
4.3.3 Nomenclatura.....	137
4.4 Modelagem matemática do crescimento de <i>Lactobacillus plantarum</i> em <i>chopped</i> suíno cozido embalado a vácuo e armazenado em diferentes temperaturas.....	138
4.4.1 Artigo 4: Growth modeling of <i>Lactobacillus plantarum</i> in vacuum-packaged cooked chopped pork at different temperatures.....	138
4.4.2 Informações complementares.....	155
4.4.3 Nomenclatura.....	159
4.5 Avaliação da capacidade preditiva dos modelos secundários.....	160
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES	167
CAPÍTULO 6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	169
CAPÍTULO 7- REFERÊNCIAS	170
ANEXOS	187
Anexo I.....	188
Anexo II.....	190

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 3.1. Modelos primários usados para ajustar os dados de crescimento das BAL.	43
Tabela 3.2. Modelos secundários usados para descrever a influência da temperatura nos parâmetros de crescimento das BAL.	44
Tabela 3.3. Índices estatísticos para comparação dos modelos.	45
Tabela 3.4. Valores utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional para a elaboração do modelo preditivo de crescimento de <i>L. plantarum</i> .	50
Tabela 3.5. Ensaio experimentais extras realizados para a validação do modelo preditivo.	51

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo 1

Table 1. Primary growth models used to fit the growth of LAB.	69
Table 2. Secondary models used to describe the influence of temperature on the growth parameters of LAB.	70
Table 3. Statistical indices for comparison of the models.	71
Table 4. Range of statistical indices values for Gompertz, Logistic, modified Logistic, and Baranyi-Roberts models, obtained by fitting the growth curves of <i>L. plantarum</i> at six temperatures.	72
Table 5. Range of statistical indices values for Gompertz, Logistic, modified Logistic, and Baranyi-Roberts models, obtained by fitting the growth curves of <i>L. viridescens</i> at six temperatures.	73
Table 6. Range of statistical indices values for Gompertz, Logistic, modified Logistic, and Baranyi-Roberts models, obtained by fitting the growth curves of <i>L. sakei</i> at six temperatures.	74
Table 7. Secondary models for <i>L. plantarum</i> , <i>L. viridescens</i> and <i>L. sakei</i> growth parameters.	79

Informações Complementares

Tabela 4.1. Coeficientes de correlação (R^2) obtidos pelos ajustes dos modelos secundários que descrevem a influência da temperatura nos parâmetros de crescimento λ (h), μ (h^{-1}) e A de <i>L. plantarum</i> , <i>L. viridescens</i> e <i>L. sakei</i> .	83
Tabela 4.2. Valores dos índices estatísticos para os modelos da raiz quadrada e potência, ajustados aos valores de μ (h^{-1}) de <i>L. plantarum</i> , <i>L. viridescens</i> e <i>L. sakei</i> em função da temperatura.	84
Tabela 4.3: Valores dos parâmetros de crescimento observados (Obs) e preditos (Pred) pelos modelos secundários de <i>L. plantarum</i> , <i>L. viridescens</i> e <i>L. sakei</i> e os valores dos índices estatísticos (bias e exatidão) calculados para estes modelos.	86

Artigo 2

Table 1. The mean values and standard deviation for growth parameters of <i>Lactobacillus plantarum</i> at different temperatures.	99
Table 2. Statistical indices <i>L. plantarum</i> at different temperatures profiles.	105

Informações Complementares

Tabela 4.4. Valores dos parâmetros e índices (Equação 5) definidos para os diferentes perfis de temperatura 4-12°C, 5-15°C e 20-30°C..... 111

Artigo 3

Table 1. Kinetic parameters (λ and μ) of experiments from previous data of *Lactobacillus plantarum* and calculated K..... 121

Table 2. Observed (Obs) and predicted growth rate (μ , h⁻¹) by response surface model (RSM) of *L. plantarum* for the central composite rotatable design. 122

Table 3. Regression coefficient results from the results of the central composite rotatable design..... 123

Table 4: Analysis of variance (ANOVA) of the predictive model obtained for growth rate according to the CCRD. 123

Table 5. Observed (Obs) and predicted growth rate (μ) by response surface model (RSM) of *L. plantarum* for mathematical validation..... 128

Artigo 4

Table 1. *Lactobacillus plantarum* growth parameters and statistical indices obtained by fitting the Gompertz model to the growth curves determined at different temperatures for vacuum-packaged cooked chopped pork. 145

Table 2. Sensorial attributes mean for vacuum-packaged cooked chopped pork at different storage temperatures (4, 10 and 16°C). 149

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 - REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 2.1. Curva típica de crescimento microbiano em função do tempo..... 27
Figura 2.2. Representação gráfica do modelo linear de três fases..... 31

CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS

- Figura 3.1. Exemplo de placa do Bioscreen C usada na realização dos experimentos, onde os poços são preenchidos com diferentes meios MRS. 53
Figura 3.2: Bioscreen C utilizado neste trabalho..... 53
Figura 3.3. *Chopped* em latas fornecido pela indústria e o produto fatiado..... 59

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Figura 4.1: Valores dos parâmetros de crescimento calculados a partir dos dados de absorbância a diferentes níveis de inóculo (Log UFC/mL) de *L. plantarum* em MRS a 30°C..... 65

Artigo 1

- Figure 1. Example of *L. plantarum* growth curves in MRS broth at different temperatures..... 75
Figure 2. Example of *L. viridescens* growth curves in MRS broth at different temperatures..... 76
Figure 3. Example of *L. sakei* growth curves in MRS broth at different temperatures.. 76
Figure 4. Temperature effect on the LAB growth parameters. 78

Informações Complementares

- Figura 4.2. Relação entre os parâmetros de crescimento observados vs preditos pelos modelos secundários obtidos para *L. plantarum*.. 87
Figura 4.3. Relação entre os parâmetros de crescimento observados vs preditos pelos modelos secundários obtidos para *L. viridescens*..... 88
Figura 4.4. Relação entre os parâmetros de crescimento observados vs preditos pelos modelos secundários obtidos para *L. sakei*..... 89
Figura 4.5. Exemplo das análises de pH de *L. plantarum* nas diferentes temperaturas ao longo do tempo. 90
Figura 4.6: Acompanhamento da curva de crescimento (■) e do pH (□) no cultivo de *L. plantarum* a 30°C. 90

Artigo 2

- Figure 1. Example of *L. plantarum* isothermal growth curves in MRS broth at different temperatures..... 98
Figure 2. Temperature effect on the *Lactobacillus plantarum* growth parameters..... 100
Figure 3. Growth curves of *L. plantarum* under non-isothermal conditions..... 103
Figure 4. Growth curves of *Lactobacillus plantarum* under non-isothermal conditions. Top: the experimental and predicted growth curves 104

Informações Complementares

- Figura 4.7. Curvas de crescimento de *Lactobacillus plantarum* sob condições isotérmicas e não isotérmicas.. 110

Figura 4.8. Exemplo do acompanhamento do pH durante o cultivo de *L. plantarum* sob condições não isotérmicas..... 111

Artigo 3

Figure 1. Response surfaces and contour curves for the growth rate (μ , h^{-1}) of *L. plantarum* 125

Informações Complementares

Figura 4.9. Curvas de crescimento de *Lactobacillus plantarum*..... 135

Figure 4.10. Relação entre a concentração celular (Log N (UFC/mL)) e os dados de absorvância (Log₁₀ abs) de *Lactobacillus plantarum* a 30°C..... 135

Figura 4.11. Representação gráfica da velocidade de crescimento (h^{-1}) observada e predita pelo modelo da superfície de resposta, nas condições do delineamento experimental (a) e nas condições da validação matemática (b)..... 136

Artigo 4

Figure 1. *Lactobacillus plantarum* growth curves fitted by Gompertz model in slices of vacuum-packaged cooked chopped pork at different storage temperatures..... 144

Figure 2. Behavior of pH values during the growth of *L. plantarum* (CFU/g) in slices of vacuum-packaged cooked chopped pork at different storage temperatures..... 147

Figure 3. Linear regression of the sensorial global quality (Q) over time (days), at storage temperatures of 4°C (a), 10°C (b) and 16°C (c). 150

Informações Complementares

Figura 4.12. Efeito da temperatura nos parâmetros de crescimento de *Lactobacillus plantarum* em *chopped* 156

Figura 4.13: Exemplo dos dados de crescimento de BAL (—●—) e contagem total (-Δ-) em *chopped*, armazenado em condições de aerobiose (coluna 1) e a vácuo (coluna 2), nas temperaturas de 4°C (a), 10°C (b) e 16°C (c). 157

Figura 4.14. Valores de pH para as amostras de *chopped* embalado em aerobiose (a) e a vácuo (b) nas temperaturas de 4°C (□), 10°C (Δ) e 16°C (○) 157

Figura 4.15. Predição da curva de crescimento de *Lactobacillus plantarum* inoculado em *chopped* sob condições não isotérmicas. 158

Avaliação da capacidade preditiva dos modelos secundários.

Figura 4.16. Comparação entre os modelos preditos para a fase lag (λ) de *L. plantarum*, *L. viridescens* e *L. sakei* em meio MRS e a fase lag de BAL em diferentes produtos cárneos..... 161

Figura 4.17. Comparação entre os modelos preditos para a velocidade de crescimento (μ) de *L. plantarum*, *L. viridescens* e *L. sakei* cultivadas em meio MRS, e *L. plantarum* cultivada em meio MRS modificado..... 163

Figura 4.18. Comparação dos modelos preditos para o aumento logarítmico da população (A) de *L. plantarum*, *L. viridescens* e *L. sakei* cultivadas em meio MRS e o aumento logarítmico da população observado em diferentes produtos cárneos 163

Figura 4.19 Comparação das curvas de crescimento construídas a partir do modelo de Gompertz modificado utilizando-se os parâmetros de crescimento obtidos para *L. plantarum*, *L. viridescens*, *L. sakei* e dados da literatura..... 165

RESUMO

As bactérias ácido lácticas (BAL) são um dos principais grupos de micro-organismos responsáveis pela deterioração de produtos cárneos embalados a vácuo e em atmosfera modificada, armazenados sob temperatura de refrigeração. A microbiologia preditiva é considerada uma importante ferramenta para quantificar e prever o comportamento microbiano sob influência de diferentes fatores ambientais, como por exemplo, a temperatura. Assim sendo, o objetivo geral deste trabalho foi modelar o crescimento de BAL em condições isotérmicas e não isotérmicas de cultivo. Primeiramente foram ajustados quatro modelos primários às curvas de crescimento de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus viridescens* e *Lactobacillus sakei* em meio de cultivo MRS sob seis diferentes temperaturas isotérmicas (entre 4°C e 30°C), sendo que o modelo primário que apresentou melhor ajuste aos dados experimentais foi o modelo de Gompertz. Foram avaliados também cinco modelos secundários, sendo que a influência da temperatura foi melhor descrita pela equação da potência para a fase lag (λ), o modelo da raiz quadrada para a velocidade de crescimento (μ) e a equação do tipo Arrhenius para o aumento logarítmico da população (A). Com base nos modelos selecionados, foi estabelecido um modelo de crescimento não isotérmico, baseado na metodologia proposta por Corradini e Peleg. O modelo proposto foi validado com dados experimentais de *L. plantarum* em meio MRS sob três diferentes perfis de temperatura. A partir de um delineamento composto central rotacional, um modelo de superfície de resposta foi estabelecido para prever a velocidade de crescimento de *L. plantarum* em meio MRS, sob diferentes temperaturas (4°C a 16°C), pH (5,5 a 7,5), NaCl (0 a 6%) e Na-lactato (0 a 4%). Todos os fatores estudados foram estatisticamente significativos ($p < 0,10$) no intervalo de confiança estudado e usados para a construção do modelo, sendo que o fator que apresentou a maior significância foi a temperatura, seguido pelo NaCl, Na-lactato e pH. Este modelo de superfície de resposta foi validado matematicamente com condições adicionais realizadas dentro do domínio do delineamento experimental. O crescimento de *L. plantarum* também foi analisado quando esta bactéria foi inoculada em um produto cárneo, *chopped* suíno cozido, embalado a vácuo e armazenado sob diferentes temperaturas isotérmicas (4°C, 10°C e 16°C). O modelo primário de Gompertz ajustou-se bem às curvas de crescimento e os modelos secundários foram os mesmos selecionados no caso do crescimento da bactéria em meio MRS. Não foram observadas mudanças sensoriais no produto quando *L. plantarum* atingiu a população máxima (10^7 UFC/mL). Os modelos preditivos estabelecidos neste estudo podem ser úteis para prever, dentro dos limites estabelecidos para cada modelo, o comportamento de bactérias ácido lácticas em produtos cárneos.

Palavras-chave: bactérias ácido lácticas, microbiologia preditiva, temperatura, modelo de crescimento não isotérmico.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are the main microorganism group responsible for the spoilage of modified atmosphere or vacuum-packaged meat products, stored under refrigeration. The predictive microbiology is an important tool to quantify and predict microbial behavior under the influence of different environmental factors, such as temperature. Then, the overall aim of this study was to model the LAB growth in isothermal and non-isothermal conditions. Firstly, four primary models were fitted to the growth curves of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus viridescens* and *Lactobacillus sakei* in MRS broth under six different isothermal temperatures (4°C to 30°C), being the Gompertz model the primary model that showed the best fit to the experimental data. Five secondary models were also evaluated, and the influence of temperature on the lag phase duration (λ) was better described by the power equation, the square root for the maximum specific growth rate (μ), and the Arrhenius-type equation for the microbial population increase (A). Based on selected models, the non-isothermal growth model was established, based on the methodology proposed by Corradini and Peleg. The model proposed was validated with experimental growth curves of *L. plantarum* in MRS obtained under three periodic temperature profiles. From a central composite rotatable design, the response surface model was established to predict *L. plantarum* growth rate in MRS broth, under different temperatures (4°C to 16°C), pH (5.5 to 7.5), NaCl (0 to 6%) and Na-lactate (0 to 4%). All the factors were statistically significant ($p < 0.10$) and used to build the model, where the temperature was the most decisive factor, followed by the concentrations of NaCl and Na-lactate and by the pH. This model was mathematically validated with additional conditions within model range. *L. plantarum* growth was also analyzed when this bacteria was inoculated in a meat product, cooked chopped pork, vacuum packaged and stored under different isothermal temperatures (4°C, 10°C and 16°C). The Gompertz model showed a good fit to growth curves and the secondary models were the same ones selected in the case of growth in MRS broth. There were no sensory changes in the product when *L. plantarum* reached the maximum population. The predictive models established in this study can be useful for predicting, within the limits set for each model, the behavior of lactic acid bacteria in meat products.

Keywords: lactic acid bacteria, predictive microbiology, temperature, non-isothermal growth model.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A deterioração dos alimentos devido à ação de micro-organismos é um problema de grande importância econômica e social, que afeta tanto as indústrias de alimentos como os consumidores (ZURERA-COSANO et al., 2006). O comportamento dos micro-organismos nos alimentos é determinado pelas propriedades destes alimentos, bem como pelas condições de armazenamento (NAKASHIMA et al., 2000). Em especial, no caso das carnes e dos produtos cárneos, devido à sua alta atividade de água (a_w), presença de nutrientes e condições favoráveis de pH, estes produtos são especialmente susceptíveis à deterioração microbiana.

As bactérias ácido lácticas (BAL) foram identificadas como a principal população deteriorante de produtos cárneos embalados a vácuo e em atmosfera modificada, além de outros produtos cárneos processados armazenados sob temperatura de refrigeração (BORCH et al., 1996; HUGAS, 1998; NYCHAS et al., 2008). A deterioração causada por estas bactérias é primordialmente devido à produção de metabólitos que causam mudanças indesejáveis na aparência, textura e *flavor* do alimento, produzindo odores e sabores desagradáveis, além de formar limo na superfície dos produtos (SAMELIS et al., 2000; CAYRÉ et al., 2003).

Dentre os principais fatores responsáveis pelas reações de deterioração nos alimentos, especialmente na deterioração microbiana, a temperatura é o que apresenta maior destaque, uma vez que os parâmetros cinéticos de crescimento são altamente dependentes deste fator (GIANNUZZI et al., 1998; LABADIE, 1999). Portanto, é essencial o controle da temperatura ao longo de toda cadeia de frio, caso contrário pode ocorrer o desenvolvimento microbiano rápido, diminuindo a vida de prateleira do produto e podendo colocar em risco a saúde do consumidor (MASSAGUER, 2005). Neste sentido, diversos estudos têm sido realizados para avaliar a importância da temperatura no armazenamento de produtos cárneos, focando no efeito dos abusos de temperatura, bem como nas variações da mesma durante o armazenamento, interferindo diretamente na qualidade e na segurança destes produtos (KOUTSOUMANIS et al., 2005; McMEEKIN et al., 2006; PELEG, 2006).

Além do controle da temperatura, muitas estratégias são utilizadas nas indústrias de alimentos para aumentar a vida de prateleira dos produtos, como o uso de agentes

químicos. Dentre estes compostos, o cloreto de sódio (NaCl) é o mais importante a ser adicionado aos alimentos, pois exerce um efeito bacteriostático, além de realçar o sabor dos mesmos (NEUMEYER et al., 1997). Outros sais, como o lactato de sódio (Na-lactato), têm sido usados para controlar o crescimento microbiano, aumentando assim a vida de prateleira de produtos cárneos (DEVLIEGHERE et al., 2000). Este sal também melhora os atributos sensoriais, além de minimizar a oxidação lipídica (MANCINI et al., 2010; ZHOU et al., 2010). Deste modo, torna-se importante o estudo das interações entre os diferentes fatores ambientais que afetam a capacidade de sobrevivência e de multiplicação dos micro-organismos.

O contínuo progresso da ciência e da tecnologia na preservação dos alimentos envolve o desenvolvimento de novas ferramentas na microbiologia de alimentos. Neste contexto, a necessidade de garantir a segurança microbiológica e a qualidade dos alimentos tem estimulado a aplicação das ferramentas da microbiologia preditiva (NAKASHIMA et al., 2000). No campo da pesquisa, que basicamente se concentra no desenvolvimento de modelos matemáticos para descrever o crescimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes em alimentos, tem havido um crescente interesse na aplicação desta ferramenta (ANTWI et al., 2008).

Os modelos matemáticos preditivos têm sido usados para quantificar e prever o comportamento microbiano sob diferentes condições ambientais (fatores intrínsecos e extrínsecos), tais como a temperatura, pH, a_w , condições de embalagem, entre outros (ZWIETERING et al., 1990; BRUL et al., 2008). Dentre estes, os modelos primários descrevem o comportamento dos micro-organismos com o tempo e os modelos secundários demonstram como os parâmetros obtidos nos modelos primários se comportam com a variação de um ou mais fatores ambientais.

Muitos modelos matemáticos são baseados em condições ambientais constantes para determinar os valores dos parâmetros cinéticos de crescimento. No entanto, condições tais como temperatura, pH ou composição da atmosfera gasosa nem sempre se mantêm constantes durante o armazenamento de alimentos refrigerados. Devido a isto, nos últimos anos, a modelagem matemática está orientada para obtenção de modelos dinâmicos, ou seja, modelos que permitam prever a segurança ou vida útil dos alimentos sob condições que variam com o tempo, principalmente condições não isotérmicas (CORRADINI et al., 2006; SMITH-SIMPSON et al., 2007; VELOGUTI et al., 2010).

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi modelar o crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isotérmicas e não isotérmicas de cultivo, trabalhando em um sistema *in vitro* e aplicando ao produto. Para atingir este objetivo geral, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Obter os parâmetros de crescimento (duração da fase lag (λ), velocidade específica máxima de crescimento (μ) e aumento logarítmico da população (A)) de *L. plantarum*, *L. viridescens* e *L. sakei* em meio de cultivo MRS sob diferentes condições isotérmicas de incubação, pelo ajuste e comparação de diferentes modelos primários aos dados experimentais;
- Escolher o melhor modelo secundário para descrever a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo primário selecionado;
- Estabelecer de um modelo preditivo do crescimento de *L. plantarum* em condições não isotérmicas, a partir do modelo primário e dos modelos secundários obtidos em condições isotérmicas;
- Validar o modelo não isotérmico proposto com a realização de cultivos de *L. plantarum* em meio MRS sob condições de temperatura variáveis;
- Estabelecer e validar um modelo para descrever os efeitos combinados de diferentes temperaturas, pH, NaCl e Na-lactato sobre a velocidade de crescimento de *L. plantarum* em meio MRS, através de um delineamento composto central rotacional;
- Avaliar e modelar o crescimento de *L. plantarum* inoculado em fatias de *chopped* suíno cozido embaladas a vácuo sob diferentes temperaturas de armazenamento;
- Avaliar a relação entre o crescimento de *L. plantarum* e a qualidade sensorial do produto cárneo analisado.
- Comparar a capacidade preditiva dos modelos obtidos em meio de cultura para descrever o crescimento de BAL em diferentes produtos cárneos.

Para tanto, este trabalho está estruturado em capítulos, onde a introdução é apresentada neste capítulo 1, e no capítulo 2 a revisão da literatura, abordando os assuntos referentes ao tema proposto neste trabalho. No capítulo 3, estão descritos os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento do trabalho, sendo que os itens 3.1 e

3.2 foram desenvolvidos no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), e os itens 3.3 e 3.4 foram desenvolvidos no Laboratório de Bromatologia e Tecnologia de Alimentos da Universidade de Córdoba (UCO), Espanha, sob orientação da Prof^a Rosa María García-Gimeno. Os resultados e as discussões estão apresentados no capítulo 4, sendo que este capítulo está apresentado sob a forma de artigos. No capítulo 5 estão as conclusões, no capítulo 6 as sugestões para trabalhos futuros e no capítulo 7 as referências da literatura.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Bactérias ácido lácticas

As bactérias ácido lácticas (BAL) compreendem um grupo amplo de microorganismos, mas que apresentam características morfológicas, metabólicas e fisiológicas comuns. São bactérias Gram positivas, geralmente imóveis, apresentam-se sob a forma de cocos ou bacilos não esporulados, que obtêm sua energia pela fermentação de carboidratos produzindo ácido láctico, podendo ser homo ou heterofermentativas. As homofermentativas produzem ácido láctico como produto principal da fermentação da glicose e as heterofermentativas produzem menos ácido láctico, além de produzirem etanol e, em alguns casos, ácido acético e dióxido de carbono (CO₂) (MASSAGUER, 2005; FRANCO e LANDGRAF, 1996). As BAL se subdividem em quatro gêneros: *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*.

As BAL têm sua importância na preservação dos alimentos, interferindo na multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas por meio de mecanismos como: competição por oxigênio, produção de substâncias antagônicas, especialmente bacteriocinas, entre outros (AMMOR et al., 2006). Entretanto, o crescimento incontrolável de algumas espécies de BAL pode causar deterioração em carnes e produtos cárneos.

As BAL foram identificadas como a maior população deteriorante de produtos embalados a vácuo e em atmosfera modificada, além de outros produtos cárneos processados armazenados sob temperatura de refrigeração. A deterioração causada por estas bactérias é primordialmente devido à produção de metabólitos que causam mudanças indesejáveis na aparência, textura e *flavor* do alimento, produzindo odores e sabores desagradáveis, além de formar limo na superfície dos produtos (BORCH et al., 1996; SAMELIS et al., 2000; CAYRÉ et al., 2003; NYCHAS et al., 2008). Linhagens de BAL geralmente consideradas como naturais em carnes e produtos cárneos são: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus curvatus* e *Leuconostoc mesenteroides* (HUGAS, 1998). Entre estas, *L. plantarum*, *L. sakei* e *L. viridescens* são as estudadas neste trabalho.

Farag e Korashy (2006), após isolarem as principais bactérias presentes em amostras de carne e de alguns produtos cárneos (carne picada, hambúrguer, salsicha, entre outros), chegaram à conclusão que as bactérias predominantes em todas as amostras examinadas eram: *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc mesenteriodes*.

Zwietering et al. (1991) modelaram curvas de crescimento de *L. plantarum* em meio MRS a diferentes temperaturas de incubação, e Van Impe et al. (1995) utilizaram os dados deste micro-organismo deteriorante para estabelecer o modelo dinâmico de crescimento e inativação. García-Gimeno et al. (2002) estudaram a aplicação dos modelos baseados em redes neurais, para a verificação dos efeitos da concentração de NaCl, pH e temperatura de armazenamento, nos parâmetros de crescimento de *L. plantarum*, por considerar que este micro-organismo era um importante deteriorante de produtos cárneos.

Devlieghere et al. (1998) isolaram *L. sakei* de presunto cozido e consideraram esta bactéria como representativa na deterioração de produtos cárneos cozidos e embalados em atmosfera modificada, avaliando o efeito de diferentes concentrações de CO₂ e temperatura no crescimento deste micro-organismo. Por sua vez, Vaikousi et al. (2009) avaliaram a aplicabilidade de um indicador microbiano de tempo e temperatura para monitorar a deterioração de carne picada embalada em atmosfera modificada, sendo que o micro-organismo indicador utilizado foi *L. sakei*.

Em outro estudo, Nicolai et al. (1993) observaram que, em carnes embaladas a vácuo, a deterioração a temperaturas abaixo de 20°C foi dominada pelo crescimento de BAL. Algumas espécies heterofermentativas como os *L. viridescens* podem produzir peróxidos que reagem com os pigmentos da carne, causando o esverdeamento da mesma. Park et al. (2001) descrevem *L. viridescens* como um dos principais micro-organismos deteriorantes de carnes processadas e investigaram o efeito do tratamento de alta pressão hidrostática sobre este micro-organismo.

2.2 Deterioração em produtos cárneos

Entre os vários parâmetros que podem determinar a qualidade de um alimento, os mais importantes são aqueles que definem as suas características microbiológicas. (FRANCO e LANDGRAF, 1996). A carne e os produtos cárneos, devido à sua alta atividade de água (a_w), pH e presença de nutrientes, são sensíveis à deterioração

microbiana (PEXARA et al., 2002). A quantidade e os tipos de micro-organismos que irão se desenvolver nos produtos cárneos, dependem desde a qualidade das matérias primas, passando pelo processamento, distribuição, armazenamento, até o momento do consumo (VELD, 1996; TERRA, 2000).

As alterações indesejáveis nos alimentos levam a grandes perdas econômicas para as indústrias, tornando fundamental a aplicação de tecnologias para conseguir produtos com maior qualidade. A temperatura e a atmosfera que envolve os produtos alimentícios durante o armazenamento, são parâmetros sobre os quais a maioria das indústrias intervêm para garantir a qualidade do alimento e, desta maneira, estender sua vida de prateleira (PEXARA et al., 2002). As embalagens a vácuo ou com atmosfera modificada são técnicas de proteção amplamente aplicadas na indústria de carnes, retardando o desenvolvimento microbiano e os processos oxidativos nos produtos (GRAY et al., 1996; KOUTSOUMANIS et al., 2008).

Segundo a ANVISA (2001), entende-se por produto alterado ou deteriorado aquele que apresenta alterações e ou deteriorações físicas, químicas e ou organolépticas, em decorrência da ação de micro-organismos e ou por reações químicas e ou físicas. As alterações nos produtos cárneos podem ser evidentes em alguns casos (danos físicos, crescimento visível de fungos, mudanças na cor ou odores estranhos), no entanto, são mais difíceis de detectar a simples vista, quando as alterações são devido à reações físico-químicas e ou microbiológicas, que desencadeiam mudanças na textura, perda de sabor, formação de metabólicos, entre outros (VELD, 1996; RODRÍGUEZ-PÉREZ, 2004).

Entre as reações físico-químicas se destacam as mudanças na cor e a formação de odores e sabores estranhos, como por exemplo, a rancificação, devido aos processos de oxidação, calor, entre outros. Assim, o estudo das interações físico-químicas e microbiológicas torna-se de grande importância para se ter um melhor e mais completo conhecimento nos mecanismos de alteração dos alimentos (VELD, 1996).

Entretanto, a determinação na qualidade de um alimento também deve ser analisada do ponto de vista sensorial, de forma conjunta com as análises microbiológicas e físico-químicas. Por isto as indústrias de produtos cárneos utilizam a análise sensorial como uma importante, e cada vez mais crescente, ferramenta no desenvolvimento, otimização, controle de qualidade e avaliação de mercado de um determinado produto (STONE e SIDEL, 2004; SLONGO, 2008).

Desta maneira, é importante avaliar a qualidade dos produtos cárneos realizando tanto análises microbiológicas e/ou físico-químicas, além da determinação da qualidade do ponto de vista sensorial.

2.3 Importância dos fatores extrínsecos no crescimento microbiano

A capacidade de sobrevivência ou multiplicação dos micro-organismos que estão presentes em um alimento depende das próprias características do alimento, ou seja, fatores intrínsecos, bem como os relacionados com o ambiente em que o alimento se encontra, os fatores extrínsecos. Dentre os fatores intrínsecos, encontram-se a atividade de água, a acidez (pH), o potencial de oxi-redução, a composição química, a presença de fatores antimicrobianos naturais e as interações entre os micro-organismos presentes nos alimentos. Entre os extrínsecos pode-se destacar a temperatura e umidade relativa ambientais, como também a composição da atmosfera que envolve o alimento (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

Neste trabalho, será dado ênfase à temperatura e à presença de fatores antimicrobianos como os conservantes químicos (cloreto de sódio e lactato de sódio), e pH.

2.3.1 Temperatura

A temperatura é o principal fator responsável pelas reações de deterioração dos alimentos, especialmente a deterioração microbiana, onde os parâmetros cinéticos de crescimento são altamente dependentes da temperatura (GIANNUZZI et al., 1998; LABADIE, 1999). Alimentos refrigerados são normalmente armazenados entre 0 e 10°C. Apesar dos micro-organismos psicrófilos e psicrotróficos serem capazes de se multiplicar a temperaturas de refrigeração, as velocidades de multiplicação diminuem consideravelmente nesta faixa de temperatura. A refrigeração também reduz as alterações químicas, físicas e bioquímicas dos alimentos e aumenta assim a vida de prateleira dos mesmos. No entanto, a refrigeração só torna esses processos mais lentos, não os elimina. Portanto, é essencial que a cadeia de frio seja controlada, caso contrário pode ocorrer o desenvolvimento microbiano rápido, diminuição da vida de prateleira do produto e ocorrência de risco à saúde do consumidor (MASSAGUER, 2005).

A logística de transporte adotada e a armazenagem fria, passando pela venda no comércio e então a geladeira do consumidor, são pontos críticos para a qualidade e

segurança global dos produtos cárneos (KOUTSOUMANIS et al., 2005). Segundo Nychas et al. (2008), as condições de temperatura nos refrigeradores de mercados desempenham um papel significativo na qualidade final do alimento e alguns estudos mostram uma grande variação na temperatura dos produtos. Sabe-se que muitos pontos de vendas não praticam um armazenamento seguro dos produtos refrigerados e/ou congelados, com a variação da temperatura no período do dia e da noite, afetando significativamente a qualidade e a segurança dos alimentos

O controle da temperatura é dificultado entre o momento da venda, o armazenamento doméstico e o tempo de preparo e de consumo. Algumas evidências de variações de temperatura são descritas em pesquisas que abordaram a distribuição de alimentos refrigerados. Em países no sul da Europa, 30% dos alimentos refrigerados foram mantidos acima de 10°C em mercados e refrigeradores domésticos, enquanto que, no norte europeu, 5% estavam acima de 13°C no varejo e 21% acima de 10°C em armazenamento doméstico (KENNEDY et al., 2005 citado por NYCHAS et al., 2008). Um estudo avaliando o controle da temperatura em equipamentos que armazenam alimentos congelados e mantidos sob refrigeração, foi realizada no sul do Brasil por Murmann et al. (2004). Foram investigados 163 equipamentos (50 congeladores, 51 refrigeradores, 14 câmaras frias, 38 balcões de refrigeração e 10 balcões de congelamento) em 45 estabelecimentos. Do total de equipamentos, 57% estava com a temperatura acima da permitida. Em relação à refrigeração, 34% dos equipamentos estava com temperatura inadequada, chegando a encontrar um refrigerador com a temperatura de 22°C. Estes autores citam ainda que, em pesquisa realizada por Chesca et al. (2001), na cidade de Uberaba em Minas Gerais, foi constatado que 70% dos estabelecimentos que comercializavam alimentos trabalhavam com temperaturas inadequadas de armazenamento.

Com os relatos apresentados, fica evidente o abuso de temperatura que os alimentos sofrem, demonstrando a importância de estudos que levem em consideração as flutuações de temperatura em armazenamento refrigerado.

2.3.2 Conservantes químicos

Enquanto a temperatura é o fator mais importante nas condições de armazenamento, influenciando diretamente o crescimento dos micro-organismos em alimentos, o cloreto de sódio (NaCl) é o mais importante produto adicionado em muitos

alimentos. Este sal atua sobre os micro-organismos inibindo ou retardando seu crescimento, reduz a atividade de água, além de atuar no desenvolvimento de propriedades sensoriais dos alimentos (DAVEY e DAUGHTRY, 1995; NEUMEYER et al., 1997).

O lactato de sódio, devido à sua atividade antimicrobiana, tem sido sugerido como uma possível alternativa na substituição de nitritos/nitratos em alimentos (SHELEF, 1994; KITAKAWA, 2002). O lactato de sódio foi regulamentado como regulador de acidez pela portaria SVS/MS nº 1004/98 (BRASIL, 1999), para produtos cárneos frescos embutidos ou não; produtos secos, curados e/ou maturados embutidos ou não; produtos cozidos embutidos ou não; produtos salgados crus ou cozidos e conservas e semiconservas de origem animal, sem limite máximo de aplicação. Em níveis de 2 a 4% podem ser aplicados em alimentos para proporcionar propriedades emulsificantes e umectante, controlar o pH, aumentar a capacidade de retenção de água, retardar a oxidação lipídica, além de acentuar o sabor e aroma e estender a vida de prateleira de produtos cárneos (BREWER et al., 1991; KITAKAWA, 2002; SALLAM, 2007; MANCINI et al., 2010; ZHOU et al., 2010). De acordo com Wit et al. (1990), citado por Souza (2005), nos produtos cárneos embalados a vácuo e mantidos sob temperatura de refrigeração, onde predominam as BAL, o lactato exerce ação inibitória sobre estas bactérias.

2.3.3 pH

Para todos os micro-organismos existem valores de pH mínimo, ótimo e máximo para sua multiplicação. Verifica-se que o pH em torno da neutralidade (6,5 – 7,5) é o mais favorável para a maioria dos micro-organismos. Alguns micro-organismos são favorecidos pelo meio ácido, como ocorre com as BAL, certamente porque há inibição da microbiota de competição. No caso de *L. plantarum*, o pH mínimo de crescimento é de 3,5, o pH ótimo é de 5,5-6,5 e o pH máximo é de 8 (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

As carnes, em função do seu pH, são altamente suscetíveis à multiplicação dos micro-organismos presentes. A carne bovina (moída) apresenta pH de 5,1 a 6,2, a de frango de 6,2 a 6,4, já alguns produtos cárneos cozidos como o presunto apresenta pH em torno de 6,2 e a salsicha 6,4 (DEVLIEGHERE et al., 2000; FRANCO e LANDGRAF, 1996). A deterioração dos produtos cárneos está associada a um conjunto

de fatores extrínsecos e intrínsecos, que determinará o tipo de micro-organismo que se desenvolverá nestes produtos, como por exemplo, o pH, a temperatura, atmosfera que envolve os produtos, entre outros fatores.

2.4 Microbiologia preditiva

A microbiologia preditiva tem enfoque interdisciplinar em que se conjugam a microbiologia, a matemática, a estatística e a ciência de alimentos, com o objetivo de descrever, por meio de equações matemáticas, o comportamento dos micro-organismos frente a combinações de condições ambientais específicas (McDONALD e SUN, 1999). Há um crescente interesse no campo de pesquisa da microbiologia preditiva, principalmente relativo ao desenvolvimento de modelos matemáticos que descrevem o crescimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes em alimentos (ANTWI et al., 2008).

De acordo com Van Impe et al. (1995), a microbiologia preditiva oferece modelos matemáticos com um desenvolvimento preciso e ao mesmo tempo com versatilidade. Segundo Shimoni e Labuza (2000), trata-se de uma área promissora que está em grande desenvolvimento na microbiologia de alimentos. Ela tem recebido significativa atenção científica nos últimos anos, fornecendo base de dados e pacotes de *softwares* que podem ser ferramentas úteis na análise de riscos. Conforme Valík et al. (1999), a microbiologia preditiva estuda o comportamento de micro-organismos sob diferentes condições químicas, físicas e físico-químicas, tais como temperatura, atividade de água, pH ou compostos antimicrobianos. Isto pode ajudar a identificar os pontos críticos da produção e processos de distribuição, além da otimização da produção e distribuição em cadeia. A microbiologia preditiva também tem utilidade na elaboração de planos de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), identificando perigos e pontos críticos, especificando limites e ações corretivas (McMEEKIN e ROSS, 2002).

O verdadeiro poder das abordagens feitas pela microbiologia preditiva é que, ao contrário do processo tradicional de armazenamento, os modelos uma vez validados, podem ser utilizados para prever com rapidez e segurança a resposta do micro-organismo sob várias condições, dentro dos limites investigados (temperatura, pH, concentração de sal, etc). Isto faz com que a microbiologia preditiva seja considerada

uma ferramenta muito útil para os microbiologistas de alimentos na tomada de decisões diárias (McCLURE et al., 1994).

2.4.1 Modelos matemáticos

Os modelos matemáticos tem sido analisados sob dois aspectos principais. Os *modelos probabilísticos* que tem por objetivo prever a probabilidade de ocorrência de alguns eventos, em um conhecido período de tempo, e os *modelos cinéticos* que têm por objetivo representar o aumento ou a diminuição de uma população microbiana de interesse (ROSS e McMEEKIN, 1994; NAKASHIMA et al., 2000). Estes modelos descritos poderiam ser do tipo empírico, que descrevem um conjunto de dados através de uma relação matemática conveniente, ou do tipo determinístico, que fornecem a interpretação dos parâmetros do modelo em termos de fenômenos e processos conhecidos (McMEEKIN et al., 1993).

Whiting e Buchanan (1993) classificaram os modelos matemáticos em três níveis: modelos primários, modelos secundários e modelos terciários. Os modelos primários descrevem o comportamento da população microbiana com o tempo e os modelos secundários demonstram como os parâmetros obtidos nos modelos primários se comportam com a variação de um parâmetro ambiental. Os autores descrevem os modelos terciários como *softwares* utilizados para resolver os modelos de nível primário e secundário.

2.4.1.1 Modelos primários de crescimento

Os modelos primários descrevem as mudanças na concentração de micro-organismos em função do tempo, em um ambiente específico. Utilizam-se, de maneira clássica, três parâmetros na caracterização de uma curva de crescimento microbiano: a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}), a duração da fase lag (λ) e a população máxima atingida (n_{\max}) ou aumento logarítmico da população ($n_{\max} - n_0$). Estes parâmetros de crescimento podem ser observados na Figura 2.1, onde $\ln N$ = logaritmo neperiano da concentração celular.

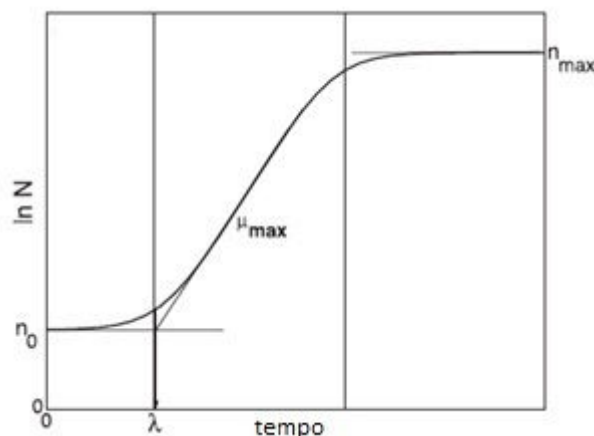


Figura 2.1. Curva típica de crescimento microbiano em função do tempo. Fonte: Swinnen et al., 2004.

Os modelos primários de crescimento mais utilizados na literatura são o modelo de Gompertz ou Gompertz modificado, modelo Logístico, modelo Logístico modificado, modelo de Baranyi e Roberts, e modelo linear de três fases, também conhecido como modelo de Buchanan. Estes modelos serão brevemente descritos a seguir.

Modelo de Gompertz ou Gompertz modificado

O modelo de Gompertz é uma função exponencial dupla, que descreve uma curva sigmóide assimétrica e está apresentado na Equação 1 (GIBSON et al., 1987). A base deste modelo é que, devido à limitação de espaço e/ou nutrientes, bem como a produção de metabólitos tóxicos, a velocidade de crescimento aumentaria até um máximo e depois então diminuiria. Desta maneira, a velocidade máxima de crescimento exponencial é determinada no ponto de inflexão na curva (McKELLAR e LU, 2004).

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

onde $\text{Log} N$ é o logaritmo decimal da densidade microbiana no tempo t , N_0 é o valor da assíntota inferior (equivalente ao log da densidade microbiana inicial), A é o aumento da densidade microbiana (equivalente ao log da contagem microbiana máxima durante a fase estacionária menos o log da contagem inicial), B é a velocidade de crescimento relativa no tempo M (h^{-1}) e M é o tempo requerido para alcançar a velocidade de crescimento máxima (h). A partir destes parâmetros, a velocidade de crescimento

máxima (μ) (h^{-1}) (Equação 2) e a duração da fase lag (λ) (h) (Equação 3) podem ser calculadas ($e=2,7182$).

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

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

O modelo de Gompertz foi reparametrizado por Zwietering et al. (1991) (Equação 4), com o objetivo de obter a representação direta dos parâmetros de interesse biológicos λ e μ , resultando no modelo de Gompertz modificado. Por ser uma reparametrização, os dois modelos apresentam ajustes similares.

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

Este modelo é bastante utilizado para descrever o comportamento microbiano em diferentes meios de cultivo e alimentos (JUNEJA e MARKS, 1999; NAKASHIMA et al., 2000; CAYRÉ et al., 2003; SLONGO et al., 2009).

Modelo Logístico

A diferença entre o modelo Logístico e o modelo de Gompertz é que, no primeiro, a curva logística é descrita por uma curva sigmóide simétrica (GIBSON et al., 1987). Este modelo é representado pela Equação 5.

$$\text{Log}\left(\frac{N}{N_0}\right) = \frac{A}{\{1 + \exp[-B \cdot (t - M)]\}} \quad (5)$$

onde os parâmetros do modelo apresentam os mesmos significados da equação 1. Sendo o parâmetro μ dado pela Equação 6 e o parâmetro λ pela Equação 7.

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

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

A aplicação do modelo Logístico é mais limitada quando comparada com o modelo de Gompertz. Este modelo tem sido utilizado, por exemplo, no ajuste de curvas de crescimento de micro-organismos deteriorantes em peixe (DALGAARD et al., 1997; KOUTSOUMANIS e NYCHAS, 2000), além de ter sido utilizado na avaliação da significância do tamanho de inóculo na fase lag de *Listeria monocytogenes* (AUGUSTIN et al., 2000).

Modelo Logístico modificado

Para corrigir uma falha do modelo Logístico, onde o ajuste do modelo, em muitos casos, não parte do ponto de origem, uma nova versão foi proposta por Corradini e Peleg (2005), chamada de Logístico modificado (Equação 8).

$$\text{Log}\left(\frac{N}{N_0}\right) = \frac{a}{1 + \exp[k(t_c - t)]} - \frac{a}{1 + \exp(kt_c)} \quad (8)$$

onde a, k e t_c apresentam os mesmo significados de A, B e M apresentados na equação 1, respectivamente. O segundo termo no lado direito da equação foi introduzido para satisfazer a condição de que o início da curva de crescimento seja a partir do ponto de origem, ou seja, quando $t = 0$, $\text{Log}(N/N_0) = 0$ e quando $t \rightarrow \infty$, $\text{Log}(N/N_0) \rightarrow \text{constante}$.

Modelo de Baranyi e Roberts

Baranyi e Roberts (1994) estabeleceram um modelo para fornecer uma base de dados mais mecanística ou biológica (Equação 9), incluindo uma fase de crescimento exponencial linear e uma fase lag que se calcula mediante uma função de ajuste (F(t)) (Equação 10). Um importante conceito apresentado por este modelo é que a fase lag observada é uma combinação do estado fisiológico das células e da adaptação ao novo ambiente. Se as células não estão preparadas para crescer ou a adaptação é lenta, a fase lag será estendida. Uma vez que as células tenham se adaptado ao novo ambiente, elas crescerão exponencialmente até atingir a fase estacionária, ditada por restrições do meio de crescimento (BARANYI e ROBERTS, 1994; McKELLAR e LU, 2004).

$$\text{Log}N = \text{Log}N_0 + \mu \cdot F(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m \cdot \mu \cdot F(t)} - 1}{e^{m(N_{\max} - N_0)}} \right) \quad (9)$$

onde N é a concentração celular no tempo t, N₀ é a concentração celular inicial, N_{max} é a concentração celular máxima, m é o parâmetro de curvatura do modelo e F(t) é dada pela Equação 10:

$$F(t) = t + \frac{1}{\mu} \ln \left(e^{(-\mu \cdot t)} + e^{(-h_0)} - e^{[(-\mu \cdot t) - h_0]} \right) \quad (10)$$

onde o parâmetro h₀ = μ.λ, este parâmetro é considerado aproximadamente constante em situações onde as condições de pré-inoculação das células são similares.

A maneira mais utilizada para ajustar o modelo de Baranyi e Roberts é utilizando o programa DMFit (macro do *software* Microsoft Office Excel®), desenvolvido pelos próprios autores e colaboradores. Neste programa, tem-se a opção de mudar a curvatura do modelo, através de dois parâmetros, n_{Curv} e m_{Curv}, que representam a curvatura no início e no final da fase linear, respectivamente. McKellar e Lu (2004) citam que o modelo de Baranyi e Roberts é muito utilizado na literatura (GARCÍA-GIMENO et al., 1998; PIN et al., 2000; VALÍK e PIECKOVA, 2001), e que a “popularidade” deste modelo tem sido facilitada pelo uso do DMFit, bem como o MicroFit, que são programas com acesso fácil pela internet.

Modelo linear de três fases ou modelo de Buchanan

Buchanan et al. (1997) estabeleceram um modelo primário mais simples que os anteriormente descritos. Trata-se de um modelo linear de três fases, o qual divide a curva de crescimento microbiana em três fases: fase lag, fase de crescimento exponencial e fase estacionária. A representação gráfica do modelo pode ser observada na Figura 2.2.

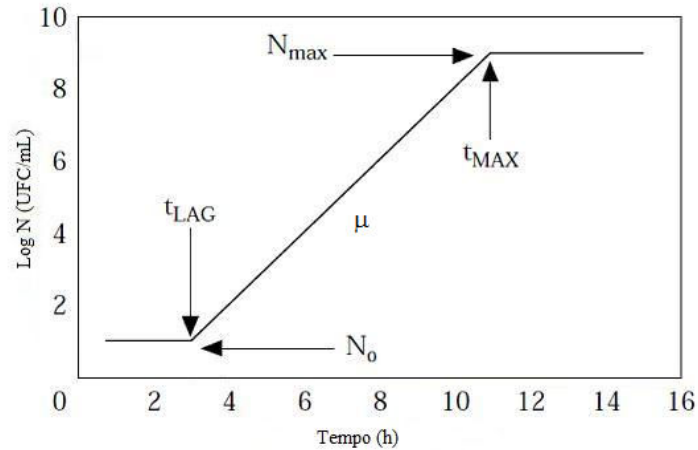


Figura 2.2. Representação gráfica do modelo linear de três fases.

Durante a fase lag, se assume que as células não se dividem, pois estão se adaptando ao novo meio. Por este motivo, a velocidade de crescimento é igual a zero. Durante a fase exponencial, assume-se que a velocidade de crescimento é uma constante, onde o logaritmo da concentração celular aumenta linearmente com o tempo (Equação 11). Uma vez alcançada a fase estacionária, não ocorre aumento das células e a velocidade de crescimento volta a ser zero. As três fases do modelo são descritas a seguir:

Fase lag:

$$\text{Para } t \leq t_{LAG}, \quad N_t = N_0$$

Fase exponencial de crescimento:

$$\text{Para } t_{LAG} \leq t \leq t_{MAX}, \quad N_t = N_0 + \mu (t - t_{LAG}) \quad (11)$$

Fase estacionária:

$$\text{Para } t \geq t_{MAX}, \quad N_t = N_{MAX}$$

onde N_t é o logaritmo da densidade celular no tempo t , N_0 é a densidade celular inicial, N_{MAX} é a densidade celular máxima, t é o tempo transcorrido, t_{LAG} é o tempo onde a fase lag termina, t_{MAX} é o tempo onde se atinge a população máxima, μ é a velocidade específica de crescimento.

Buchanan e colaboradores (1997) comparam este modelo com o modelo de Baranyi e Roberts, e Gompertz, usando dados de crescimento de *E. coli*. As curvas preditas pelos três modelos apresentaram bons ajustes e os parâmetros cinéticos de

crescimento obtidos foram similares. O modelo linear se apresentou mais robusto que os outros, especialmente quando havia poucos dados experimentais.

2.4.1.2 Modelos secundários

Os modelos secundários são equações que descrevem como variam os parâmetros de crescimento dos modelos primários com a mudança de um ou mais fatores extrínsecos e intrínsecos, como temperatura, pH, atividade de água, entre outros (WHITING, 1995). O conhecimento dos parâmetros ambientais que mais influenciam o crescimento microbiano é essencial para o desenvolvimento, bem como para o uso prático dos modelos preditivos (McKELLAR e LU, 2004).

Os modelos secundários mais utilizados na literatura são o modelo da raiz quadrada, também conhecido como Bélerádek, e a equação de Arrhenius, que são os dois principais modelos secundários que têm sido propostos para descrever o efeito da temperatura no crescimento microbiano (RATKOWSKY et al., 1982; McMEEKIN e ROSS, 2002; CAYRÉ et al., 2003; MATARAGAS et al., 2006). O modelo da raiz quadrada é dado pela Equação 12 e a equação de Arrhenius pela Equação 13.

$$\sqrt{k} = b(T - T_{\min}) \quad (12)$$

onde k é o parâmetro de interesse do modelo, b representa o coeficiente de regressão, T é a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e T_{\min} é a temperatura mínima para o crescimento ou coeficiente do modelo.

$$k = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad (13)$$

onde k é a velocidade de crescimento, A é a constante da equação (fator pré-exponencial), T é a temperatura (K), E_a é a energia de ativação para o crescimento microbiano (kJ/mol) e R representa a constante universal dos gases (8,314 J/K.mol) (McDONALD e SUN, 1999).

A clássica equação de Arrhenius, em alguns casos, não descreve bem o efeito da temperatura nas velocidades de crescimento dos micro-organismos. Por este fato, vários modelos secundários são baseados na equação de Arrhenius, realizando modificações

mecanísticas e/ou empíricas na equação original (KOUTSOUMANIS e NYCHAS, 2000; PHUA e DAVEY, 2007; BAHADORI e VUTHALURU, 2010). A equação do tipo Arrhenius é dada pela Equação 14 (GIL et al., 2006).

$$\ln k = a \left(\frac{1}{T} \right) + b \quad (14)$$

onde k é o parâmetro de interesse do modelo, a e b são coeficientes do modelo e T é a temperatura (°C).

Além destes dois modelos, a influência dos fatores ambientais sobre os parâmetros de crescimento pode ser descrita através de equações lineares, exponenciais, polinomiais ou superfície de resposta, redes neurais, conforme o melhor ajuste aos dados propostos (CORRADINI e PELEG, 2005).

O modelo de superfície de resposta é a mais frequente técnica utilizada para descrever a relação entre combinações de fatores ambientais e os parâmetros das curvas de crescimento (DEVLIEGHERE et al., 2000; GARCÍA-GIMENO, et al., 2002), bem como a determinação de condições ótimas de processos (LIU et al., 2004; NASRABADI e RAZAVI, 2010). Por exemplo, quando são analisadas quatro variáveis independentes em um planejamento experimental, a relação matemática da resposta destas variáveis pode ser definida por uma equação polinomial quadrática de segunda ordem, sendo representada pela Equação 15 (BARROS et al., 1995; RODRIGUES e IEMMA, 2005).

$$\begin{aligned} Y = & b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_4 X_4 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 \\ & + b_{33} X_3^2 + b_{44} X_4^2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{14} X_1 X_4 \\ & + b_{23} X_2 X_3 + b_{24} X_2 X_4 + b_{34} X_3 X_4 \end{aligned} \quad (15)$$

onde Y é a resposta predita, b_0 é média dos coeficientes de regressão, X_1 , X_2 , X_3 e X_4 são as variáveis independentes, b_1 , b_2 , b_3 e b_4 são os coeficientes lineares, b_{11} , b_{22} , b_{33} e b_{44} são os coeficientes quadráticos, e b_{12} , b_{13} , b_{14} , b_{23} , b_{24} e b_{34} são os coeficientes das interações.

Zurera-Cosano et al. (2006) avaliaram a capacidade de um modelo de superfície de resposta prever os parâmetros de crescimento de *Leuconostoc mesenteroides*, cultivada sob distintas combinações de temperatura, pH, cloreto de sódio e nitrato de

sódio. Os autores concluíram que os modelos propostos são adequados para a estimativa dos parâmetros de crescimento do micro-organismo. Já em outro estudo, Rodrigues et al. (2006) aplicaram a metodologia de superfície de resposta para determinar a composição ótima de um meio de cultivo para a produção de biossurfactantes por bactérias probióticas (*Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus*).

2.4.1.3 Modelos terciários

Os modelos terciários são aplicações de um ou mais modelos primários e secundários, incorporados a *softwares*, cujo uso facilita a aplicação das equações matemáticas. Como vantagem, estes programas apresentam respostas rápidas e eficientes ao avaliar o crescimento microbiano em um determinado produto sob condições específicas, não se fazendo necessário o uso de recursos experimentais (WHITING, 1995; McDONALD e SUN, 1999; McMEEKIN e ROSS, 2002; LEBERT e LEBERT, 2006).

Muitos modelos de predição foram desenvolvidos, tanto para micro-organismos deteriorantes como para patogênicos, que apresentam seus respectivos modelos de crescimento e inativação. Como exemplos destes programas podem ser citados:

- *Seafood Spoilage Safety Predictor* (SSSP) (<http://sssp.dtuaqua.dk/>);
- *Pathogen Modeling Program* (PMP) (BUCHANAN, 1993), (<http://pmp.arserrc.gov/>);
- *Growth Predictor* (Institute of Food Research, UK, <http://www.ifr.ac.uk/safety/growthpredictor>);
- Combase (ComBase Consortium, <http://www.combase.cc/>);
- Sym'Previus (LEPORQ et al., 2005) (<http://www.symprevius.org>);
- *Food Spoilage Predictor* (NEUMEYER et al., 1997).

2.4.1.4 Modelos não isotérmicos

Como descrito anteriormente, os modelos matemáticos são usados para quantificar e prever o comportamento microbiano sob diferentes condições ambientais, sendo que muitos destes modelos são baseados em dados experimentais a condições constantes. No entanto, condições tais como a temperatura, pH ou a composição da atmosfera, entre outros, nem sempre se mantêm constantes durante o armazenamento. Por isto, nos últimos anos, tem aumentado o interesse por modelos

dinâmicos, ou seja, modelos que permitam prever o crescimento dos microorganismos sob condições que variam com o tempo de armazenamento, principalmente condições não isotérmicas (McMEEKIN et al., 2006; PELEG, 2006).

Para que os modelos matemáticos possam ser aplicáveis a alimentos armazenados em condições reais, é necessário considerar, dentro do modelo, o efeito das mudanças da temperatura de armazenamento sob o crescimento microbiano, a fim de se obter previsões mais precisas em relação à inocuidade e à vida de prateleira dos mesmos (CAYRÉ et al., 2004). Para o estabelecimento de um modelo não isotérmico, algumas considerações são definidas de acordo com cada estudo, dependendo do microorganismo e do ambiente de crescimento. Na literatura, alguns modelos não isotérmicos são propostos, entre eles o modelo de Corradini e Peleg (2005) e o modelo de Van Impe et al. (1992).

Segundo Corradini e Peleg (2005), a base do desenvolvimento de um modelo de crescimento não isotérmico é dada por duas etapas principais. A primeira etapa consiste em gerar os dados de crescimento microbiano em diferentes temperaturas constantes, ajustando um modelo primário aos dados para a obtenção dos parâmetros de crescimento. Em seguida, a influência da temperatura nestes parâmetros é descrita pelos modelos secundários. Para estimar o crescimento microbiano sob condições de flutuação de temperatura, a forma diferencial do modelo primário deve ser usada, com a inclusão dos modelos secundários.

No modelo desenvolvido por estes autores, assume-se que, a velocidade de crescimento não isotérmica momentânea é a velocidade isotérmica à temperatura momentânea, a um determinado tempo que corresponde ao nível de crescimento momentâneo da população. Mais uma vez, a velocidade de crescimento momentânea em condições não isotérmicas depende não só da mudança da temperatura, mas também da mudança do estado fisiológico da população em crescimento (CORRADINI et al., 2006; PELEG, 2006).

O modelo de crescimento de Corradini e Peleg foi proposto a partir de dois modelos primários, sendo o primeiro uma equação empírica simples e o segundo o modelo Logístico modificado (Equação 8, onde $\text{Log}(N/N_0) = y(t)$). A derivada em relação ao tempo do modelo Logístico modificado está representada pela Equação 16.

$$\frac{dy(t)}{dt} \underset{(T_{cte})}{=} \frac{k(T)a(T)\exp[k(T)(t_c(T)-t)]}{[1 + \exp(k(T)(t_c(T)-t))]^2} \quad (16)$$

onde os parâmetros do modelo são $a(T)$ que é a população máxima atingida, $k(T)$ é relacionado ao crescimento na fase exponencial (h^{-1}) e $t_c(T)$ é o ponto de inflexão na curva (h).

A influência da temperatura nos parâmetros de crescimento pode ser representada por equações empíricas, considerando que a temperatura varia com o tempo $[T(t)]$:

$$a(T) = a[T(t)] \quad (17)$$

$$k(T) = k[T(t)] \quad (18)$$

$$t_c(T) = t_c[T(t)] \quad (19)$$

Com a inclusão destes parâmetros representados pelas Equações 17, 18 e 19 na derivada em relação ao tempo da equação do modelo de Logístico modificado (Equação 16), pode ser obtida a Equação 20, que representa o modelo de crescimento não isotérmico.

$$\frac{dy(t)}{dt} = \frac{k[T(t)]a[T(t)]\exp(k[T(t)]\{t_c[T(t)] - t^*\})}{[1 + \exp(k[T(t)]\{t_c[T(t)] - t^*\})]^2} \quad (20)$$

onde t^* é definido pela Equação 21 e representa o tempo que corresponde a qualquer nível de crescimento isotérmico, e é dado pelo inverso da Equação 8.

$$t^* = \frac{1}{k(T)} \log_e \left[\frac{\exp[k(T)t_c(T)](a(T) + y(t)\{1 + \exp[k(T)t_c(T)]\})}{a(T)\exp[k(T)t_c(T)] - y(t)\{1 + \exp[k(T)t_c(T)]\}} \right] \quad (21)$$

O modelo foi aplicado aos dados de crescimento isotérmicos e não isotérmicos de *Pseudomonas* spp. em peixe refrigerado (0°C a 8°C) (KOUTSOUMANIS, 2001) e *Escherichia coli* em caldo nutriente (27,6°C a 36°C) (FUJIKAWA et al., 2004). Segundo os autores, o procedimento pode ser usado para gerar as curvas de crescimento sob histórias térmicas complicadas que podem incluir oscilações de temperaturas, visto que as curvas de crescimento preditas estavam coerentes com os dados experimentais obtidos.

Outro modelo não isotérmico proposto na literatura é o modelo de Van Impe et al. (1992). Segundo estudo realizado por Zwietering et al. (1990 e 1991), o modelo de

Gompertz foi usado para ajustar os dados de crescimento de *L. plantarum*, cultivada em MRS a diferentes temperaturas isotérmicas (6°C a 43°C). Já a influência da temperatura foi melhor descrita pelo modelo da raiz quadrada modificado, para os parâmetros μ e A e por um modelo hiperbólico para o parâmetro λ . Com base nestes modelos, Van Impe e colaboradores estabeleceram um modelo não isotérmico em duas etapas. Primeiramente foi desenvolvido um modelo não isotérmico somente para o crescimento microbiano. Em uma segunda etapa foi incluída a inativação e a possível transição do crescimento até a inativação. Van Impe et al. (1995) descrevem uma abordagem mais geral para definir este modelo não isotérmico de crescimento e inativação.

Smith-Simpson et al. (2007) simularam o crescimento de *Clostridium perfringens* em carne moída sob condições não isotérmicas a partir do modelo de Corradini e Peleg (2005). Os autores ajustaram equações exponenciais para descrever a influência da temperatura na velocidade de crescimento e na fase lag. A população microbiana máxima foi considerada constante. A simulação foi validada com os dados experimentais não isotérmicos.

Em outro estudo, Gospavic et al. (2008) modelaram o crescimento de *Pseudomonas* spp. em frango sob condições de temperaturas variáveis. Estes autores simularam o crescimento não isotérmico baseando-se no modelo proposto por Van Impe et al. (1995), e na derivada do modelo de Baranyi e Roberts (BARANYI e ROBERTS, 1994). Somente o modelo secundário da raiz quadrada foi usado neste trabalho para modelar a influência da temperatura na velocidade de crescimento do micro-organismo. Os autores concluíram que os dois modelos foram capazes de simular o crescimento do micro-organismo sob condições não isotérmicas.

2.5 Validação dos modelos

Para que os modelos possam ser aplicados, é fundamental que estes sejam validados. Segundo Rodríguez-Pérez (2004), a validação dos modelos preditivos pode ser realizada com os mesmos dados utilizados para estabelecer o modelo. Este tipo de validação é chamada de validação interna, e tem como objetivo determinar se o modelo pode descrever bem os dados experimentais. Já a validação externa, utiliza novos dados experimentais, os quais não foram usados para gerar o modelo, porém obtidos dentro dos limites do modelo estabelecido. Esta validação também pode ser realizada

utilizando dados da literatura, que pode ser tanto uma validação matemática ou diretamente em um produto alimentício.

A aplicação de uma técnica estatística adequada permite uma avaliação da capacidade de predição do modelo que está sendo validado (NAKASHIMA et al., 2000). Na microbiologia preditiva, alguns índices matemáticos podem ser usados para avaliar a confiabilidade ou qualidade do ajuste (*goodness of fit*) dos modelos preditivos de crescimento, bem como para comparar o ajuste de uma série de modelos aos dados utilizados para a sua elaboração (McCLURE et al., 1994). Os índices matemáticos normalmente utilizados na literatura são o coeficiente de correlação (R^2), o erro médio quadrático (MSE) ou raiz do erro médio quadrático (RMSE), o fator bias e o fator exatidão.

O primeiro indicador sobre a confiabilidade de um modelo é o R^2 . Este índice mede a fração de variação sobre a média que é explicada pelo modelo. Quanto maior o valor ($0 < R^2 < 1$), melhor é a predição obtida pelo modelo.

O índice RMSE ou MSE é uma medida da variabilidade residual (Equação 22). O valor mais baixo deste índice significa a melhor capacidade do modelo descrever os dados (SUTHERLAND et al., 1994). Segundo McKellar e Lu (2004), provavelmente a mais simples e informativa medida de bom ajuste para modelos de regressão, linear e não linear, é o RMSE. A discrepância média entre os dados observados e os valores preditos, pode ser causada por vários motivos, incluindo a variabilidade natural ou erros sistemáticos.

$$MSE = \frac{\sum (\text{Valor}_{\text{observado}} - \text{Valor}_{\text{predito}})^2}{n - p} \quad (22)$$

onde n é o número de dados experimentais e p é o número de parâmetros do modelo.

Segundo Nau (2010), para propósitos comparativos entre resultados, é melhor que os valores sejam reportados em termos de RMSE ao invés de MSE, porque o RMSE é medido na mesma unidade dos dados, ao invés de unidades ao quadrado. Estes índices são mais sensíveis do que outras medidas aos grandes erros ocasionais: o processo de elevação ao quadrado fornece peso desproporcional aos erros muito grandes. Se um erro grande ocasional não é um problema na situação estudada, eles não

são critérios adequados. Não existe nenhum critério para um “bom” valor de RMSE ou MSE, pois isto depende das unidades no qual a variável é medida.

Ross (1996) propôs dois índices simples para avaliar o desempenho dos modelos, o fator bias (Equação 23) e o fator exatidão (Equação 24). Estes índices são amplamente utilizados na literatura, pois proporcionam um fácil resumo da confiabilidade dos modelos e ainda servem no processo de validação dos modelos preditivos. Também são usados para comparar o ajuste de modelos primários (CHOWDHURY et al., 2007; ZHOU et al., 2008; SAUCEDO-REYES et al., 2009; ZIMMERMANN et al., 2010). O objetivo inicial destes índices foi estimar a qualidade do ajuste dos modelos, quando se comparavam com observações que não tinham sido utilizadas para gerar o modelo predito. Onde n é o número de dados experimentais.

$$\text{fator bias} = 10^{\left(\frac{\sum \log(\text{Valor}_{\text{predito}} / \text{Valor}_{\text{observado}})}{n} \right)} \quad (23)$$

$$\text{fator exatidão} = 10^{\left(\frac{\sum |\log(\text{Valor}_{\text{predito}} / \text{Valor}_{\text{observado}})|}{n} \right)} \quad (24)$$

O fator bias proporciona uma medida do desvio estrutural do modelo. Com este índice é avaliado se os valores preditos estão acima ou abaixo da linha de equivalência e também em que medida se aproxima a concordância perfeita. O valor de bias > 1 indica que o modelo é seguro para o caso da velocidade de crescimento, cujo valor observado é inferior ao estimado pelo modelo preditivo. Neste sentido, o modelo proporciona uma margem de segurança. Ao contrário, um valor de bias < 1 para a fase lag significa que a predição estimada é segura, pois a fase lag observada é maior que a predita pelo modelo (ROSS, 1996).

O fator exatidão calcula a média da distância entre cada ponto e a linha de equivalência, como uma medida de quão próximas, da média, as predições estão das observações. Quanto maior o valor do fator de exatidão, menos exata é a estimação. Por exemplo, um valor de 1,7 indica que as predições diferem em 70% das observações.

Quando ambos índices (bias e exatidão) tem o valor de 1, significa que existe concordância perfeita entre os valores observados e os preditos pelo modelo. Estes índices foram estabelecidos para avaliar um modelo com apenas um parâmetro, porém

quando o modelo apresenta mais parâmetros (pH, a_w , NaCl, entre outros) o fator de exatidão poderá ser aumentado em 10 a 15% (0,10 - 0,15) para cada variável no modelo (ROSS et al., 2000).

Os valores dos parâmetros cinéticos observados podem ser representados graficamente em relação às predições correspondentes do modelo matemático avaliado. A partir desta representação, pode-se visualizar rapidamente quais as predições que poderiam resultar inseguras na prática e ainda estimar a confiabilidade do modelo (DEVLIEGHERE et al., 2000; CARRASCO et al., 2006).

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelagem matemática do crescimento de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus viridescens* e *Lactobacillus sakei* em diferentes temperaturas de incubação.

3.1.1 Micro-organismos e meio de cultivo

As bactérias ácido lácticas (BAL) *Lactobacillus plantarum* (CCT 0580 ATCC 8014, Lote 07.05), *Lactobacillus viridescens* (CCT 5843 ATCC 12706, Lote 22.07) e *Lactobacillus sakei* (CCT 5841 ATCC 15521, Lote 05.03) foram adquiridas na forma liofilizada da coleção de culturas da Fundação Tropical de Culturas André Tosello (Campinas, Brasil). As cepas foram reidratadas conforme indicação e cultivadas em meio de cultivo MRS (Man, Rogosa e Sharpe) - *Lactobacillus* (Acumedia Manufactures, Inc. Lansing, Michigan, USA). As cepas foram estocadas em tubos *ependorf* com meio MRS contendo 20% de glicerol a -24°C até a utilização.

3.1.2 Condições de crescimento

A reativação das culturas puras de *L. plantarum*, *L. viridescens* e *L. sakei* para o preparo dos inóculos foi realizada em meio MRS a 30°C por 18 h. Este tempo foi estabelecido com base em estudos prévios realizados no laboratório, que indicaram que neste tempo a bactéria se encontra no início da fase estacionária. Depois deste período, foram realizados os experimentos para avaliar o crescimento destas bactérias em seis diferentes temperaturas de incubação: 4 e 8°C (temperaturas de refrigeração), 12, 16 e 20°C (abusos de temperatura) e 30°C (temperatura ótima de crescimento). Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL, com volume de trabalho de 160 mL de meio MRS e com 1% (v/v) de inóculo. O pH inicial do meio de cultivo foi ≈ 6 . Os frascos foram incubados em estufa (Dist, Florianópolis, Brasil) e as curvas de crescimento acompanhadas até a fase estacionária. Para cada BAL e temperaturas testadas, foram geradas quatro curvas de crescimento: duas duplicatas em dias diferentes (ensaios independentes), à exceção da bactéria *L. sakei* para a qual foram geradas duas curvas a 16, 20 e 30°C.

3.1.3 Amostragem

Amostras de 2 mL foram coletadas assepticamente em câmara de fluxo laminar (CFLV-09, Veco, Campinas, Brasil) em intervalos de tempo pré-estabelecidos, dependendo da temperatura de incubação. Após a coleta das amostras, foi realizado o acompanhamento do crescimento das BAL através de leituras de absorvância e pH, como descrito a seguir:

Absorvância: a avaliação e o acompanhamento do crescimento microbiano foram realizados através de medidas de absorvância (abs) em espectrofotômetro (1105, Bel Photonics, Monza, Itália). As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 600 nm em cubeta de vidro. O branco utilizado foi água destilada. Para manter uma precisão adequada (região linear), a faixa de absorvância utilizada foi entre 0,0 e 0,8. A partir deste valor, foram feitas diluições para manter a linearidade. As medidas de absorvância foram realizadas em intervalos de tempo pré-estabelecidos até que as curvas de crescimento atingissem a fase estacionária. As curvas para cada experimento foram construídas plotando $\ln(\text{abs}/\text{abs}_0)$ versus tempo (h). O termo abs representa medida de absorvância no tempo t e abs_0 a absorvância inicial.

pH: o acompanhamento do pH foi realizado através de pH-metro (V620, Analion, Ribeirão Preto, Brasil).

Plaqueamento: a análise da concentração celular das cepas na temperatura ótima foi realizada através de plaqueamento em agar MRS (Acumedia) com dupla camada, em placas de Petri estéreis descartáveis, incubadas a 30°C por 48 h. A contagem foi realizada nas placas com colônias desenvolvidas em número de 25 a 250, sendo a contagem expressa em UFC/mL.

3.1.4 Modelagem matemática das curvas de crescimento das BAL

3.1.4.1 Modelos Primários

A partir dos dados de crescimento das BAL, obtidos nas seis temperaturas de incubação testadas, diferentes modelos primários foram ajustados para a obtenção dos parâmetros de crescimento: duração da fase lag (λ), velocidade específica máxima de crescimento (μ) e aumento logarítmico da população microbiana (A). Os modelos

primários testados e comparados foram: modelo de Gompertz (ZWIETERING et al., 1990), modelo Logístico (ZWIETERING et al., 1990), modelo Logístico modificado (CORRADINI e PELEG, 2005) e o modelo de Baranyi-Roberts (BARANYI e ROBERTS, 1994). A Tabela 3.1 apresenta as equações que representam cada modelo primário. As curvas de crescimento foram ajustadas pelo *software* Matlab 7 (MathWorks[®], Natick, USA) com os modelos de Gompertz, Logístico e Logístico modificado, e pelo programa DMFit (macro do *software* Microsoft Office Excel[®] - BARANYI e ROBERTS, 1994) com o modelo Baranyi-Roberts.

Tabela 3.1. Modelos primários usados para ajustar os dados de crescimento das BAL.

Modelos Primários	Equações
Gompertz	$\ln\left(\frac{abs}{abs_0}\right) = A \cdot \exp\left\{-\exp[-B \cdot (t - M)]\right\}$ $\mu = \frac{A \cdot B}{e} \quad \lambda = M - \frac{1}{B}$
Logístico	$\ln\left(\frac{abs}{abs_0}\right) = \frac{A}{[1 + \exp[-B \cdot (t - M)]]}$ $\mu = \frac{A \cdot B}{4} \quad \lambda = \frac{(M - 2)}{B}$
Logístico modificado	$\ln\left(\frac{abs}{abs_0}\right) = \frac{A}{[1 + \exp[-B \cdot (t - M)]]} - \frac{A}{[1 + \exp(M \cdot B)]}$ $\mu = \frac{A \cdot B}{4} \quad \lambda = \frac{(M - 2)}{B}$
Baranyi-Roberts	$abs = abs_0 + \mu \cdot F(t) - \frac{1}{m} \ln\left(1 + \frac{\exp(m \cdot \mu \cdot F(t)) - 1}{\exp(m \cdot (abs_{max} - abs_0))}\right)$ $F(t) = t + \frac{1}{\mu} \ln(\exp(-\mu \cdot t) + \exp(-\mu \cdot \lambda) - \exp(-\mu(t + \lambda)))$

onde $\ln (abs/abs_0)$ é o logaritmo neperiano da densidade celular no tempo t (h), abs é a medida de absorvância no tempo t, abs_0 é a absorvância inicial, A é o aumento logarítmico da população microbiana, μ é a velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}), λ é a duração da fase lag (h), B é a velocidade de crescimento relativa no tempo M (h^{-1}), M é o tempo requerido para alcançar a velocidade de crescimento máxima (h), abs_{max} é a absorvância máxima e m parâmetro de curvatura do modelo.

3.1.4.2 Modelos Secundários

Após a obtenção dos parâmetros primários de crescimento (λ , μ e A), cinco equações correspondentes aos modelos secundários (Tabela 3.2) foram comparadas para seleção do modelo que melhor descreva a influência da variação da temperatura sobre estes parâmetros. Os modelos secundários foram ajustados usando o *software* Matlab 7.

Tabela 3.2. Modelos secundários usados para descrever a influência da temperatura nos parâmetros de crescimento das BAL.

Modelos Secundários	Equação
Linear	$k = b + rT$
Raiz Quadrada	$k^{1/2} = b(T - T_{\min})$
Tipo Arrhenius	$\ln k = a\left(\frac{1}{T}\right) + b$
Potência	$k = b.T^n$
Exponencial	$k = a.\exp(b.T)$

onde k é o parâmetro de interesse do modelo primário (μ , λ ou A), T é a temperatura ($^{\circ}\text{C}$), T_{\min} é a temperatura mínima para o crescimento ou coeficiente do modelo e a , b , r e n são coeficientes dos modelos.

3.1.5 Comparação estatística dos modelos

A comparação dos modelos matemáticos primários e secundários foi realizada através dos seguintes índices estatísticos: coeficiente de correlação (R^2), erro médio quadrático (MSE), fator bias e fator de exatidão.

O coeficiente de correlação também chamado de coeficiente de determinação ou simplesmente R^2 é uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas.

O cálculo do MSE, fator bias e fator exatidão foram realizados através das equações descritas na Tabela 3.3 (SUTHERLAND et al., 1994; ROSS, 1996).

Tabela 3.3. Índices estatísticos para comparação dos modelos.

Índices Estatísticos	Equação
MSE	$MSE = \frac{\sum (\text{Valor}_{\text{observado}} - \text{Valor}_{\text{predito}})^2}{n - p}$
Fator bias	$\text{fator bias} = 10^{\left(\frac{\sum \log(\text{Valor}_{\text{predito}} / \text{Valor}_{\text{observado}})}{n} \right)}$
Fator exatidão	$\text{fator exatidão} = 10^{\left(\frac{\sum \log(\text{Valor}_{\text{predito}} / \text{Valor}_{\text{observado}}) }{n} \right)}$

onde n é o número de dados experimentais e p é o número de parâmetros do modelo.

Para analisar estes índices, quanto menor o valor de MSE melhor é o ajuste do modelo aos dados experimentais. O fator bias representa a diferença média entre os valores observados e preditos. Este fator é um desvio relativo médio. Se bias é igual 1, a resposta observada é igual à resposta predita. No entanto, quando bias é maior que 1, significa que o valor predito é maior que o observado. Quando bias é menor que 1, significa que o valor predito é menor que o observado. O fator de exatidão é uma medida da diferença média absoluta entre os valores preditos e observados. Quanto maior o valor do fator de exatidão, menor será a exatidão da estimativa da média.

3.2 Modelagem matemática do crescimento de *Lactobacillus plantarum* em caldo MRS sob condições não isotérmicas.

3.2.1 Micro-organismo e meio de cultivo

Neste estudo, a cepa de *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) foi ativada e armazenada como descrito na seção 3.1.1.

3.2.2 Condições de crescimento

Inicialmente, foi realizado o levantamento microbiológico de *L. plantarum* nas seis condições isotérmicas de incubação, como descrito na seção 3.1.2. Posteriormente, os experimentos foram realizados em condições não isotérmicas de armazenamento, em estufa com programação automática da temperatura (Dist, Florianópolis, Brasil), produzindo os perfis não isotérmicos desejados. Foram estudados três diferentes perfis

de temperatura: 4-12°C, 5-15°C e 20-30°C, que representaram a variação de duas temperaturas em intervalos de tempo constantes (mudança a cada 12 h), até que as curvas de crescimento atingissem a fase estacionária. Durante os experimentos, as temperaturas foram registradas a cada 5 minutos por mini *data loggers* (Testo 174, Lenzkirch, Alemanha).

3.2.3 Amostragem

A amostragem foi realizada como descrito na seção 3.1.3.

3.2.4 Modelagem matemática sob condições de temperaturas variáveis

O modelo matemático de crescimento não isotérmico estabelecido neste estudo foi baseado na metodologia descrita por Corradini e Peleg (2005). Segundo estes autores, os modelos primários e secundários, obtidos a partir do ajuste de dados experimentais isotérmicos, podem ser utilizados para prever o crescimento microbiano sob uma variedade de condições não isotérmicas. Estes modelos foram usados para estabelecer as curvas de crescimento não isotérmicas, pela resolução numérica de uma equação diferencial, partindo da premissa que a velocidade de crescimento não isotérmica momentânea é a velocidade isotérmica à temperatura momentânea, a um determinado tempo que corresponde ao nível de crescimento momentâneo da população.

Com base na modelagem matemática realizada no artigo 1 (item 4.1), foi possível estabelecer um modelo de crescimento não isotérmico. O modelo primário que apresentou melhor ajuste às curvas de crescimento de *L. plantarum*, em todas as temperaturas testadas, foi o modelo de Gompertz. A partir deste modelo, foram obtidos os parâmetros de crescimento: duração da fase lag (λ), velocidade específica máxima de crescimento (μ) e aumento da população microbiana (A), nas diferentes temperaturas isotérmicas (4, 8, 12, 16, 20 e 30°C). Neste trabalho, utilizou-se a reparametrização da função de Gompertz, ou seja, Gompertz modificado (Equação 1), para obter a representação direta dos parâmetros de interesse, λ e μ (ZWIETERING et al., 1991).

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

onde $\ln(y) = \ln(abs/abs_0)$ é o logaritmo neperiano da densidade celular no tempo t , sendo abs a absorvância no tempo t e abs_0 a absorvância inicial, $A(T)$ é o aumento da população microbiana, $\mu(T)$ é a velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}), $\lambda(T)$ é a duração da fase lag (h) e $\exp(1) = 2,7182$.

A velocidade de crescimento isotérmica de acordo com este modelo é representada pela Equação 2.

$$\frac{dy(t)}{dt} = \mu(T). \exp(1). \exp\left\{\frac{\mu(T). \exp(1). (\lambda(T) - t)}{A(T)} + 1\right\} \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu(T). \exp(1). (\lambda(T) - t)}{A(T)} + 1\right]\right\} \quad (2)$$

A influência da temperatura sobre os parâmetros primários de crescimento ($\lambda(T)$, $\mu(T)$ e $A(T)$) pode ser descrita por modelos secundários, através do modelo que apresentar melhor ajuste aos dados experimentais. Para a aplicação do modelo não isotérmico é necessário conhecer como estes parâmetros de crescimento variam com a temperatura, e como esta varia com o tempo, transformando os modelos secundários em função do perfil de temperatura, ou seja, $\lambda[T(t)]$, $\mu[T(t)]$ e $A[T(t)]$. Deste modo, a velocidade de crescimento do modelo não isotérmico torna-se específica para cada história térmica estudada.

Com a inclusão dos modelos secundários e das equações que representam os perfis de temperatura $T(t)$ na Equação 2, foi obtido o modelo de crescimento não isotérmico (Equação 3).

$$\frac{dy(t)}{dt} = \mu[T(t)]. \exp(1). \exp\left\{\frac{\mu[T(t)]. \exp(1). (\lambda[T(t)] - t^*)}{A[T(t)]} + 1\right\} \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu[T(t)]. \exp(1). (\lambda[T(t)] - t^*)}{A[T(t)]} + 1\right]\right\} \quad (3)$$

onde t^* é definido pela Equação 4 e representa o tempo que corresponde a qualquer nível de crescimento isotérmico, e é dado pelo isolamento do t na Equação 1.

$$t^* = \left(\frac{\mu(T). \exp(1). \lambda(T) + A(T) - \ln\left(-\ln\left(\frac{y}{A(T)}\right)\right)}{\mu(T). \exp(1)} \right) A(T) \quad (4)$$

Neste estudo, os modelos primários e secundários foram ajustados usando o método de Levenberg-Marquardt e a solução numérica do modelo não isotérmico (equação diferencial de primeira ordem) foi realizada com o método de Runge-Kutta de quarta ordem, usando funções ODE (por exemplo, ODE 15s) no *software* Matlab 7.

A partir do modelo preditivo de crescimento não isotérmico (Equação 3), pode-se prever o crescimento do micro-organismo quando a temperatura de armazenamento varia entre 4°C e 30°C.

Para aplicação do modelo não isotérmico, foi necessário descrever o perfil de temperatura durante o armazenamento. As mudanças no perfil de temperatura podem ser descritas por qualquer modelo matemático empírico, para facilitar o cálculo das curvas de crescimento não isotérmicas (CORRADINI e PELEG, 2005; CORRADINI et al., 2006; SMITH-SIMPSON et al., 2007). Neste estudo, o perfil de temperatura pode ser descrito por uma equação senoidal, representada pela Equação 5.

$$T(t) = a_1 \cdot \text{sen}(b_1 \cdot t + c_1) + a_2 \cdot \text{sen}(b_2 \cdot t + c_2) + \dots + a_8 \cdot \text{sen}(b_8 \cdot t + c_8) \quad (5)$$

onde $T(t)$ é o perfil de temperatura (°C) no tempo t (h), e a_i , b_i e c_i são parâmetros do modelo. Além disso, a fim de representar o perfil de temperatura experimental, uma condição foi imposta para o estabelecimento da equação, ou seja, se $T \leq T_1$, $T=T_1$, e se $T \geq T_2$, $T=T_2$, onde T_1 é a menor temperatura (°C) e T_2 é a maior temperatura (°C) definida pelo perfil não isotérmico. Isto quer dizer que, por exemplo, quando $T \leq 4^\circ\text{C}$, T será fixado em 4°C e quando $T \geq 12^\circ\text{C}$, T será fixado em 12°C. Com estas condições, as temperaturas estarão dentro do perfil estudado (4-12°C).

3.2.5 Comparação estatística dos modelos

A comparação dos ajustes dos modelos primários e secundários, bem como a avaliação da capacidade preditiva do modelo de crescimento não isotérmico, foram realizadas como descrito na seção 3.1.5.

3.3 Modelagem dos efeitos combinados da temperatura, pH, cloreto de sódio e lactato de sódio na velocidade de crescimento de *Lactobacillus plantarum*.

3.3.1 Micro-organismo e preparo do inóculo

A cepa de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 utilizada neste estudo foi adquirida na forma liofilizada da Coleção Espanhola de Cultivos Tipo (CECT, Universidade de Valência, Espanha) e reidratada conforme indicação deste fornecedor. A cepa foi mantida a -18°C em tubos crioviais, contendo “anéis” porosos e meio conservante (Microbank[®], Richmond Hill, Canadá), até a utilização. Para o preparo do inóculo, um “anel” foi transferido para um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio MRS (Oxoid Ltd., Hampshire, Inglaterra) e incubado a 30°C por 24 h em estufa com 10% de CO₂ (Crenesys Instrumentation, Madri, Espanha). Em seguida, 0,1 mL da cultura foi transferido para 10 mL de MRS e incubado por mais 18 h nas mesmas condições anteriores. A partir disto, se realizaram as diluições necessárias em meio MRS modificado, em função de cada condição testada, para obter um tamanho de inóculo próximo a 10³ UFC/mL. Para saber com exatidão o número de micro-organismos presentes nas amostras, uma curva de calibração foi realizada na temperatura ótima de 30°C. Para isto, diluições decimais foram realizadas em solução salina 0,85% (Panreac, Barcelona, Espanha) e plaqueadas em agar MRS (Oxoid Ltd.) com dupla camada e incubadas a 30°C durante 48 h, em estufa com 10% de CO₂.

3.3.2 Delineamento experimental e obtenção dos dados experimentais

O comportamento de *L. plantarum* foi avaliado em função de diferentes fatores ambientais, como a temperatura de armazenamento, pH, concentração de cloreto de sódio (NaCl) e concentração de lactato de sódio (Na-lactato), que compõem o domínio do delineamento composto central rotacional (DCCR), definido por 2⁴ (16 ensaios), mais 8 ensaios axiais e 2 repetições no ponto central, totalizando 26 ensaios. Os valores utilizados nos ensaios do planejamento estão apresentados na Tabela 3.4. Os níveis das variáveis selecionadas foram escolhidos levando em conta os processos seguidos pelas indústrias de produtos cárneos, e a ampla variação entre os mesmos, teve como objetivo englobar diversas características destes produtos. Além do DCCR, 54 combinações extras dentro do domínio do delineamento foram realizadas para a validação do modelo preditivo estabelecido (Tabela 3.5).

Tabela 3.4. Matriz do delineamento composto central rotacional, com valores reais e codificados, para a elaboração do modelo preditivo de crescimento de *L. plantarum*.

Ensaio	T (°C)	pH	NaCl (%)	Na-lactato (%)
1	7 (-1)	6 (-1)	1,5 (-1)	1 (-1)
2	13 (+1)	6 (-1)	1,5 (-1)	1 (-1)
3	7 (-1)	7 (+1)	1,5 (-1)	1 (-1)
4	13 (+1)	7 (+1)	1,5 (-1)	1 (-1)
5	7 (-1)	6 (-1)	4,5 (+1)	1 (-1)
6	13 (+1)	6 (-1)	4,5 (+1)	1 (-1)
7	7 (-1)	7 (+1)	4,5 (+1)	1 (-1)
8	13 (+1)	7 (+1)	4,5 (+1)	1 (-1)
9	7 (-1)	6 (-1)	1,5 (-1)	3 (+1)
10	13 (+1)	6 (-1)	1,5 (-1)	3 (+1)
11	7 (-1)	7 (+1)	1,5 (-1)	3 (+1)
12	13 (+1)	7 (+1)	1,5 (-1)	3 (+1)
13	7 (-1)	6 (-1)	4,5 (+1)	3 (+1)
14	13 (+1)	6 (-1)	4,5 (+1)	3 (+1)
15	7 (-1)	7 (+1)	4,5 (+1)	3 (+1)
16	13 (+1)	7 (+1)	4,5 (+1)	3 (+1)
17	4 (-2)	6,5 (0)	3 (0)	2 (0)
18	16 (+2)	6,5 (0)	3 (0)	2 (0)
19	10 (0)	5,5 (-2)	3 (0)	2 (0)
20	10 (0)	7,5 (+2)	3 (0)	2 (0)
21	10 (0)	6,5 (0)	0 (-2)	2 (0)
22	10 (0)	6,5 (0)	6 (+2)	2 (0)
23	10 (0)	6,5 (0)	3 (0)	0 (-2)
24	10 (0)	6,5 (0)	3 (0)	4 (+2)
25	10 (0)	6,5 (0)	3 (0)	2 (0)
26	10 (0)	6,5 (0)	3 (0)	2 (0)

Valores reais (valores codificados).

Tabela 3.5. Ensaios experimentais extras realizados para a validação do modelo preditivo.

Ensaios	T (°C)	pH	NaCl (%)	Na-lactato(%)
1	16	6	0	1
2	16	7	0	1
3	16	6,5	0	3
4	16	6,5	1	2
5	16	6,5	2	1
6	16	6,5	2	4
7	16	6	3	0
8	16	7	3	0
9	16	6	3	4
10	16	7	3	4
11	16	6,5	4	1
12	16	6,5	4	3
13	16	6,5	5	2
14	16	6	6	0
15	16	7	6	0
16	13	7	0	0
17	13	7	0	4
18	13	6,5	0,5	3
19	13	6,5	2,5	2
20	13	6,5	3	0
21	13	6,5	3	4
22	13	6,5	3,5	2
23	13	7	6	0
24	10	7	0	0
25	10	7	0	4
26	10	6	1	1
27	10	7	1	1
28	10	6	2	3
29	10	7	2	3
30	10	7	3	2
31	10	6,5	4	0
32	10	6,5	4	1
33	7	7	0	0
34	7	7	0	4
35	7	6,5	0,5	3
36	7	6,5	2,5	2
37	7	6,5	3	0
38	7	6,5	3	4
39	7	6,5	3,5	2
40	4	7	0	0
41	4	6	0	1
42	4	7	0	1
43	4	6,5	0	3
44	4	7	1	0
45	4	6,5	1	2
46	4	6	1	4
47	4	6,5	2	1
48	4	6,5	2	4
49	4	6	3	0
50	4	7	3	0
51	4	6,5	4	1
52	4	6,5	5	2
53	4	6	6	0
54	4	7	6	0

As concentrações de cloreto de sódio (Panreac) e da solução de DL-lactato de sódio 60% (w/w) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) foram obtidas pela adição de quantidades apropriadas destes reagentes a uma série de frascos contendo 50 mL de MRS. Os frascos foram autoclavados (121°C/15min) e o pH ajustado com soluções estéreis de NaOH (5M) (Panreac) e HCl (5M) (Panreac) para obter diferentes combinações de pH. Estes meios modificados foram inoculados com *L. plantarum* para obter a concentração inicial de $\approx 10^3$ UFC/mL.

O acompanhamento do crescimento de *L. plantarum* foi realizado através de medidas de absorvância em espectrofotômetro Bioscreen C (Labsystem, Helsinki, Finlândia) a 600 nm, em intervalos de tempo pré-estabelecidos, dependendo das condições de cultivo. Os poços das placas do Bioscreen C foram preenchidos com 250 μ L de meio MRS modificado inoculado e o acompanhamento do crescimento foi realizado até que as curvas de crescimento atingissem a fase estacionária. Quatro poços por condição foram preenchidos com o meio modificado inoculado e dois poços por condição foram preenchidos com meio modificado estéril para servir de controle (sem inóculo). Este procedimento foi realizado por cinco vezes, ou seja, para as cinco temperaturas testadas.

A Figura 3.1 apresenta uma das placas usadas na realização dos experimentos. Cada placa do Bioscreen C contém 100 poços, sendo que podem ser usadas duas placas no equipamento, totalizando a leitura de 200 amostras por vez. Com a ajuda do *software Biolink*, operando em *MSDOS*, os dados de absorvância foram processados e os arquivos transferidos para planilhas do programa Excel. Outra grande vantagem deste espectrofotômetro é a programação de alguns parâmetros e com isto a realização do experimento dentro do equipamento. Neste estudo, somente o experimento a 16°C foi realizado dentro do equipamento, com a seguinte programação:

- temperatura de incubação: 16°C;
- intervalo de tempo entre as medidas: 1 h;
- intensidade de agitação das placas: média;
- momento da agitação: antes das leituras;
- tempo de agitação: 30 segundos.
- tempo do experimento: indeterminado.

Para a temperatura de incubação de 16°C, o equipamento (Bioscreen C) deveria

estar em um ambiente em que a temperatura não poderia ultrapassar 25°C. Por isto, este experimento foi realizado em uma sala com ar condicionado a 20°C para manter a temperatura ambiente constante. Já para os outros experimentos (4, 7, 10 e 13°C), as placas do Bioscreen C foram armazenadas em refrigeradores e as medições realizadas pontualmente, dependendo da temperatura de incubação. Para que não houvesse aquecimento das placas, mesmo em medições pontuais, o equipamento era programado com a respectiva temperatura do experimento e este ficava dentro de um refrigerador com a temperatura ambiente média de 8°C e umidade controlada entre 30 e 40%. A Figura 3.2 apresenta o espectrofotômetro Bioscreen C em cima de uma bancada de laboratório e dentro de um refrigerador.



Figura 3.1. Exemplo de placa do Bioscreen C usada na realização dos experimentos, onde os poços são preenchidos com diferentes meios MRS.

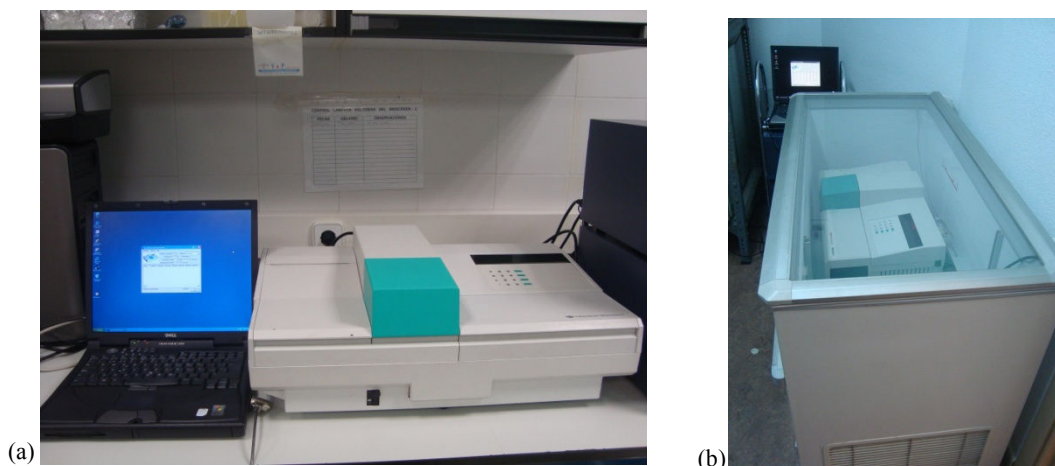


Figura 3.2: Bioscreen C utilizado neste trabalho. Temperatura ambiente (a) e dentro do refrigerador (b).

3.3.3 Modelagem matemática da velocidade de crescimento de *L. plantarum*

3.3.3.1 Modelo Primário

Os dados de crescimento de *Lactobacillus plantarum* obtidos através das leituras no Bioscreen C (dados de abs) foram transferidos para planilhas do Excel (*software* Microsoft Office Excel[®]), e analisados para calcular a velocidade de crescimento para cada condição testada. Assim, o modelo linear de três fases (BUCHANAN et al., 1997) foi aplicado para descrever o crescimento do micro-organismo expresso em \log_{10} UFC/mL vs tempo, sendo a fase exponencial calculada pela Equação 1.

$$\text{Log}_{10}N = \text{Log}_{10}N_0 + \mu \cdot t \quad (1)$$

onde Log_{10} é o logaritmo decimal, N é a concentração celular (UFC/mL) no tempo t , N_0 é a concentração celular inicial (UFC/mL), μ é a velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}) e t é o tempo (h).

O Bioscreen C limita-se a medir indiretamente a concentração celular no intervalo de $\approx 10^7$ a $\approx 10^9$ UFC/mL. Neste estudo, como as placas do Bioscreen C foram inoculadas com $\approx 10^3$ UFC/mL por poço, somente uma parte da fase exponencial foi detectada, pois a fase de adaptação (fase lag) registrada pelo equipamento, na verdade corresponde a fase lag adicionada por uma parte da fase exponencial (incluindo as contagens de 10^3 até 10^7 UFC/mL). Por isto, a Equação 1 não pode ser diretamente aplicada e algumas considerações foram estabelecidas. Primeiramente, uma correlação entre a absorbância e a concentração celular (UFC/mL) de *L. plantarum* foi determinada por meio de uma curva de calibração, resultando na relação dada pela Equação 2.

$$\text{Log}_{10}N = a \cdot \text{Log}_{10}abs + b \quad (2)$$

onde $\text{Log}_{10} N$ é o logaritmo decimal da concentração celular, abs é a absorbância, a e b são parâmetros da equação.

Na Equação 1, $\text{Log}_{10}N$ foi substituído pela Equação 2, e o parâmetro a foi isolado, como representado pela Equação 3. Este parâmetro pode ser aplicado para qualquer par de pontos na fase exponencial.

$$a = \frac{\text{Log}_{10}N_0 + \mu \cdot t_p - b}{\text{Log}_{10}abs_p} = \frac{\text{Log}_{10}N_0 + \mu \cdot t_q - b}{\text{Log}_{10}abs_q} \quad (3)$$

onde Log_{10} , N_0 , μ , e t têm o mesmo significado da Equação 1, abs , a e b têm o mesmo significado da Equação 2, e p e q são pontos quaisquer da fase exponencial do gráfico de absorbância vs tempo.

A partir da Equação 3, o parâmetro μ foi isolado, como pode ser observado na Equação 4. Esta equação envolve dados de absorbância e a concentração inicial de *L. plantarum*.

$$\mu = \frac{(\text{Log}_{10}abs_p - \text{Log}_{10}abs_q) \cdot (\text{Log}_{10}N_0 - b)}{\text{Log}_{10}abs_q \cdot t_p - \text{Log}_{10}abs_p \cdot t_q} \quad (4)$$

onde Log_{10} , N_0 , μ , e t têm o mesmo significado da Equação 1, abs e b têm o mesmo significado da Equação 2, e p e q têm o mesmo significado da Equação 3.

Na Equação 4, assume-se que não ocorre fase lag. No entanto, isto não é verdade, especialmente em condições limitantes. Por esta razão, a Equação 4 foi modificada para incluir a fase lag, como observado na Equação 5.

$$\mu = \frac{(\text{Log}_{10}abs_p - \text{Log}_{10}abs_q) \cdot (\text{Log}_{10}N_0 - b)}{\text{Log}_{10}abs_q \cdot (t_p - \lambda) - \text{Log}_{10}abs_p \cdot (t_q - \lambda)} \quad (5)$$

onde Log_{10} , N_0 , μ , e t têm o mesmo significado da Equação 1, abs e b têm o mesmo significado da Equação 2, p e q têm o mesmo significado da Equação 3 e λ é a fase lag (h).

A fase lag foi calculada com base na relação entre a velocidade de crescimento máxima (μ) e a fase lag (λ) representada na Equação 6, sendo que esta relação é descrita por muitos autores na literatura (COOPER, 1963; CHANDLER e McMEEKIN, 1985; BARANYI e ROBERTS, 1994; ROSSO, 1995; GOSPAVIC et al., 2008).

$$K = \mu \cdot \lambda \quad (6)$$

onde K é uma constante específica do micro-organismo em situações onde as condições de pré-inoculação das células são similares.

A constante K foi obtida pela aplicação da Equação 6 aos dados experimentais de *L. plantarum*, cultivada em meio MRS com inóculo inicial de 10^7 UFC/mL (dados apresentados na seção 4.1.1), onde obteve-se os parâmetros de crescimento μ e λ . Combinando as Equações 5 e 6, a expressão para calcular λ é dada pela Equação 7.

$$\lambda = \frac{K.(qt_p - pt_q)}{p.(Log_{10}N_0 - b - K) - q.(Log_{10}N_0 - b - K)} \quad (7)$$

onde Log_{10} , N_0 , e t têm o mesmo significado da Equação 1, b tem o mesmo significado da Equação 2, p e q são $Log_{10}abs_p$ e $Log_{10}abs_q$, respectivamente, e têm o mesmo significado da Equação 3, e K tem o mesmo significado da Equação 6.

Todas as considerações descritas a partir da Equação 2 até a Equação 7, admitem o uso dos dados de absorbância para descrever o crescimento de *L. plantarum*.

3.3.3.2 Desenvolvimento do modelo de superfície de resposta

O modelo de superfície de resposta (MSR) foi usado para descrever a significância estatística de diferentes variáveis (temperatura, pH, cloreto de sódio e lactato de sódio), na velocidade de crescimento de *L. plantarum*, através de um DCCR. Em um sistema envolvendo quatro variáveis independentes, a relação matemática da resposta destas variáveis pode ser definida por uma equação polinomial de segunda ordem (Equação 8) (BARROS et al., 1995; RODRIGUES e IEMMA, 2005).

$$\begin{aligned} Y = & b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 \\ & + b_{33}X_3^2 + b_{44}X_4^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 \\ & + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{34}X_3X_4 \end{aligned} \quad (8)$$

onde Y é a resposta predita, b_0 é média dos coeficientes de regressão, X_1 , X_2 , X_3 e X_4 são as variáveis independentes, b_1 , b_2 , b_3 e b_4 são os coeficientes lineares, b_{11} , b_{22} , b_{33} e b_{44} são os coeficientes quadráticos, e b_{12} , b_{13} , b_{14} , b_{23} , b_{24} e b_{34} são os coeficientes das interações.

3.3.4 Validação do modelo preditivo

Após o estabelecimento do modelo de superfície de resposta, 54 condições adicionais foram selecionadas aleatoriamente dentro do domínio do delineamento experimental, as quais foram distribuídas homogeneamente entre as cinco temperaturas estudadas (Tabela 3.5), a fim de avaliar a capacidade preditiva do modelo proposto para a velocidade de crescimento de *L. plantarum*.

3.3.5 Critérios de avaliação

Os dados experimentais obtidos pelo DCCR e pelas condições adicionais foram tratados com o *software* STATISTICA® 6.0 (StatSoft®, Tulsa, OK, USA). Este *software* também gerou as superfícies de repostas e condições de contorno. A qualidade do ajuste do modelo foi determinada pelo coeficiente de determinação (R^2) e a significância estatística ($p < 0,10$) pela análise de variância – ANOVA (*F test*).

Para avaliar a capacidade de predição do MSR, os seguintes critérios foram utilizados: raiz do erro médio quadrático (RMSE) (Equação 9), fator bias (B_f) (Equação 10) e fator exatidão (A_f) (Equação 11) (ROSS, 1996).

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (\mu_{obs} - \mu_{pred})^2}{n - p}} \quad (9)$$

$$B_f = 10^{\left(\frac{\sum \log\left(\frac{\mu_{pred}}{\mu_{obs}}\right)}{n} \right)} \quad (10)$$

$$A_f = 10^{\left(\frac{\sum \left| \log\left(\frac{\mu_{pred}}{\mu_{obs}}\right) \right|}{n} \right)} \quad (11)$$

onde μ é a velocidade específica máxima de crescimento, *obs* é o valor observado, *pred* é o valor predito, n é o número de dados experimentais e p é o número de parâmetros do modelo.

3.4 Modelagem matemática do crescimento de *Lactobacillus plantarum* em *chopped* suíno cozido embalado a vácuo e armazenado em diferentes temperaturas.

Estudo preliminar

Foi realizado um estudo preliminar com a microbiota do *chopped* suíno cozido. Os procedimentos e análises realizados foram os mesmos como será descrito a seguir, ressaltando que, nesta etapa preliminar sem inocular *L. plantarum*, o produto foi embalado a vácuo e em aerobiose. As análises microbiológicas foram realizadas em agar MRS e PCA, sendo que as placas foram incubadas a 30°C de 3-5 dias e a 30°C por 48 h, respectivamente.

3.4.1 Amostras do produto cárneo

O produto cárneo selecionado para este estudo foi *chopped* suíno cozido (Figura 3.3), que será chamado apenas de *chopped* neste trabalho, fornecido por uma empresa de Córdoba (Espanha), em latas com peso médio de 2,2 kg. O *chopped* é um produto cárneo pronto para o consumo que possui os seguintes ingredientes: carne suína (65%), água, amido de milho, sal, proteínas do leite, proteínas de soja, estabilizantes E-450 e E-451 (difosfato e trifosfato), aromas, potencializador de sabor E-621 (glutamato monossódico), antioxidante E-301 (ascorbato de sódio) e conservante E-250 (nitrito de sódio).

O produto cárneo foi fatiado em sala asséptica em um fatiador doméstico com lâmina de aço inoxidável (Demoka[®], M-381 Zeta Plus Ø, Itália), o qual foi higienizado e desinfetado com álcool 70% (v/v) por 10 minutos antes do experimento. As fatias obtidas, que pesavam aproximadamente 25 g, foram colocadas em bolsas plásticas (Sacoliva[®], Barcelona, Espanha) e em seguida inoculadas com *Lactobacillus plantarum* para obter aproximadamente 10³ UFC/g, sendo que o inóculo foi preparado conforme descrito na seção 3.4.1.1. Um conjunto de amostras não foi inoculado para ser utilizado como controle. Finalmente, as amostras foram embaladas a vácuo em uma seladora (Audionvac 151 HG, Weesp, Holanda) e divididas em três lotes, de acordo com a temperatura de armazenamento, para serem analisadas ao longo do tempo. Foram estudadas três temperaturas: 4°C (temperatura de refrigeração), 10°C (limite máximo da temperatura de refrigeração) e 16°C (abuso de temperatura).

Para verificar a eficácia do processo de desinfecção da fatiadora, placas de Rodac (*Agar Contact*) com agar padrão PCA (*Plate Count Agar*, Oxoid Ltd., Hampshire, Inglaterra) e agar MRS, foram pressionadas em três diferentes zonas da fatiadora, incluindo a lâmina. As placas de PCA foram incubadas a 30°C por 48 h e as placas de MRS a 30°C por 48 h em estufa com 10% de CO₂.



Figura 3.3. *Chopped* em latas fornecido pela indústria e um exemplo do produto fatiado.

3.4.1.1 Preparo do inóculo e inoculação no produto

A cepa utilizada neste estudo, bem como a preparação do inóculo, foram descritos na seção 3.3.1. O inóculo foi lavado, com solução salina 0,85% (Panreac, Barcelona, Espanha) por centrifugação a 4000 rpm (Jouan C4i, Thermo Electron Corporation, França) por 10 minutos, repetindo este processo duas vezes. Em seguida, as diluições decimais necessárias foram realizadas para obter o inóculo inicial de $\approx 10^3$ UFC/g que foi espalhado uniformemente na superfície de cada fatia de *chopped*, usando um bastão de vidro estéril.

3.4.2 Análises microbiológicas e físico-químicas

Primeiramente, o pH foi medido em três diferentes pontos da fatia de *chopped* usando um pH-metro para sólidos (pH/mv-meter digit 501, Crison, Barcelona, Espanha). Em seguida, 25 g do produto cárneo (uma fatia) foi transferido assepticamente para dentro de uma bolsa de Stomacher estéril e adicionado 225 mL de água peptonada 0,1% (Oxoid Ltd., Hampshire, Inglaterra), homogeneizada durante 60 segundos em Stomacher 400 (*Lab Blender*, Londres, Inglaterra). As diluições decimais necessárias foram realizadas com solução salina 0,85% e plaqueadas em

profundidade com agar MRS (dupla camada) em duplicata e incubadas a 30°C por 48 h em estufa com 10% de CO₂ para a contagem da bactéria ácido láctica. As placas foram examinadas visualmente por colônias típicas. Cada determinação microbiológica foi realizada em triplicata, ou seja, três fatias, e os resultados foram expressos pelo Log N (UFC/g), onde N é a média da contagem microbiana. A determinação do tempo de amostragem foi dependente da temperatura de armazenamento e da evolução do crescimento microbiano.

A detecção e enumeração de microrganismos patogênicos e indicadores de higiene foram realizados nas amostras de *chopped*. *Escherichia coli* β-Glicuronidase foi enumerada usando o método de Número Mais Provável (NMP) em tubos com 9 mL de caldo Lauril Triptose suplementado com MUG (4-metilumbeliferil-β-D-glicuronídeo), conforme o método oficial da AOAC 992.30. A investigação de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*, e de *Salmonella* spp. foram realizadas de acordo com as normas espanholas UNE-EN ISO 11290-2 (2000) e UNE-EN ISO 6579 (2002), respectivamente. Os controles destes micro-organismos foram realizados no início, na metade e no final dos experimentos. O preparo das amostras para estas análises seguiram o mesmo procedimento realizado para a análise da bactéria ácido láctica.

3.4.3 Análise sensorial e determinação da vida de prateleira

A avaliação sensorial do *chopped* foi realizada por uma equipe de provadores treinada (8-10 julgadores) usando um teste descritivo. Para este teste, uma ficha de avaliação foi elaborada com uma escala de 1 a 9, variando de desgostei muito (nota 1) a gostei muito (nota 9), baseada na escala de Karlsruhe (WITTING de PENNA, 1981; ANZALDUA-MORALES, 1994). Esta avaliação foi realizada através dos principais atributos organolépticos e visuais: cor, odor, sabor, aparência e aceitação geral. A ficha de avaliação e a descrição dos atributos sensoriais utilizados para os testes estão apresentadas no Anexo I (1 e 2). O grau hedônico 5 foi escolhido para indicar o início da deterioração do produto, portanto, as amostras com valores abaixo de 5, foram consideradas inaceitáveis ou rejeitadas. O procedimento para os testes sensoriais, bem como as instalações usadas para os mesmos, seguiram os padrões da norma espanhola UNE ISO 87-004-79 (1997).

A qualidade total (Q) foi calculada com base na metodologia aplicada por Bruna et al. (2001), utilizando a Equação 1:

$$Q = (\text{Cor} \times f_1) + (\text{Aparência} \times f_2) + (\text{Odor} \times f_3) + (\text{Sabor} \times f_4) \quad (1)$$

onde Q é a qualidade global, *cor*, *aparência*, *odor* e *sabor* correspondem à média dos valores para cada atributo (obtidos pela análise sensorial) e f_i corresponde ao grau de importância de cada atributo definido pelos julgadores, variando entre 0 e 1, sendo que $f_1 + f_2 + f_3 + f_4 = 1$.

Esta equação foi calculada com base na opinião dos julgadores no presente estudo, atribuindo os seguintes valores para f_i : 0,37 para a cor; 0,33 para a aparência; 0,10 para o odor e 0,20 para o sabor. O grau de importância foi também analisado pela análise da correlação entre os valores dos diferentes atributos e aceitação geral. Uma regressão linear foi realizada com os valores Q , calculados ao longo do armazenamento, para cada temperatura analisada. Para estimar a vida de prateleira em diferentes temperaturas, o limite de deterioração, ou seja, 5, foi interpolado da equação de regressão obtida para Q .

3.4.4 Modelagem matemática do crescimento de *L. plantarum* no produto cárneo

Os dados de crescimento de *Lactobacillus plantarum* obtidos no *chopped* embalado a vácuo foram ajustados pelo modelo de Gompertz (GIBSON et al., 1987), usando o programa DMFit (BARANYI e ROBERTS, 1994). O modelo de Gompertz é representado pela Equação 2.

$$\text{Log}N = N_0 + A \exp\{-\exp[-B(t - M)]\} \quad (2)$$

onde $\text{Log} N$ é o logaritmo decimal da contagem microbiana (UFC/g) no tempo t , N_0 é o valor da assíntota inferior (equivalente ao log da contagem microbiana inicial) (UFC/g), A é o aumento da contagem microbiana (equivalente ao log da contagem microbiana máxima durante a fase estacionária menos o log da contagem inicial) (UFC/g), B é a velocidade de crescimento relativa no tempo M (h^{-1}) e M é o tempo requerido para alcançar a velocidade de crescimento máxima (h). A partir disto, os seguintes parâmetros foram calculados: velocidade específica máxima de crescimento ($\mu = B.C/e$) (h^{-1}) ($e = 2,7182$), duração da fase lag ($\lambda = M - (1/B)$) (h) e a densidade da população máxima ($\text{MPD} = N_0 + A$) (Log(UFC/g)).

3.4.5 Análises estatísticas

A qualidade dos ajustes do modelo de Gompertz foi avaliada pelo coeficiente de correlação (R^2) e pelo erro médio quadrático (MSE) como descrito na seção 3.1.5. Os dados obtidos na análise sensorial foram avaliados pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) e pelas análises de regressão realizados no *software* SPSS 8.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA).

Na estatística descritiva, o coeficiente de correlação de Pearson, mede o grau de correlação, e a direção desta correlação (se positiva ou negativa), entre duas variáveis. Se $r = 0,70$ (positivo ou negativo) indica uma forte correlação, se $r = 0,30 - 0,70$ (positivo ou negativo) indica correlação moderada e se $r = 0 - 0,30$ indica fraca correlação (GÖK et al., 2008).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados são apresentados em cinco partes, como descrito a seguir:

4.1 Artigo 1: Modelagem matemática do crescimento de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus viridescens* e *Lactobacillus sakei* em diferentes temperaturas de incubação.

4.2 Artigo 2: Modelagem matemática do crescimento de *Lactobacillus plantarum* sob condições não isotérmicas.

4.3 Artigo 3: Modelagem dos efeitos combinados da temperatura, pH, cloreto de sódio e lactato de sódio na velocidade de crescimento de *Lactobacillus plantarum*.

4.4 Artigo 4: Modelagem matemática do crescimento de *Lactobacillus plantarum* em *chopped* suíno cozido embalado a vácuo e armazenado em diferentes temperaturas.

4.5 Avaliação da capacidade preditiva dos modelos secundários.

4.1 Modelagem matemática do crescimento de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus viridescens* e *Lactobacillus sakei* em diferentes temperaturas de incubação.

Devido ao grande número de experimentos gerados para o desenvolvimento de modelos preditivos, o acompanhamento do crescimento das BAL foi realizado através de medidas de absorbância, por ser um método amplamente utilizado na literatura, rápido, barato, preciso e de fácil utilização. Porém, o limite de detecção deste método e do equipamento disponível no laboratório é de 10^6 UFC/mL. Por isto, os experimentos foram realizados com 1% de inóculo, correspondendo a aproximadamente 10^7 UFC/mL de *Lactobacillus plantarum* e 10^6 UFC/mL de *Lactobacillus viridescens* e *Lactobacillus sakei*. A relação entre a concentração celular (UFC/mL) e os dados de absorbância (abs) está exemplificada para *L. plantarum* no Anexo II (Figura 1).

Para que fosse verificada a influência da concentração do inóculo nos parâmetros de crescimento, realizou-se (no grupo de trabalho) experimentos de crescimento de *L. plantarum* a 30°C para cinco diferentes níveis de inóculo, entre as concentrações de 10^3 UFC/mL a 10^7 UFC/mL. A Figura 4.1 apresenta a variação da duração da fase lag (λ), da velocidade específica máxima de crescimento (μ) e do aumento logarítmico da população (A) em função das diferentes concentrações de inóculo testadas. Pode-se observar que o aumento logarítmico da população (Figura 4.1c) e a velocidade específica máxima de crescimento (Figura 4.1b), calculados a partir de medidas de absorbância, não foram influenciadas pelos diferentes níveis de inóculo, resultando em um valor do parâmetro A com pequeno desvio padrão em relação ao valor médio, ou seja, $A = 3,23 (\pm 0,04)$. O valor do parâmetro μ também apresentou pouca variação, sendo igual a $0,415 (\pm 0,038) (h^{-1})$. A duração da fase lag foi o único parâmetro influenciado pelo nível do inóculo. Como os experimentos iniciam-se sempre com a mesma concentração celular, considerou-se que os três parâmetros de crescimento podem ser comparados nas diferentes temperaturas de incubação.

Pesquisa anterior, realizada por Sarmiento (2006) demonstrou que o estudo do crescimento de BAL puras em meio de cultivo MRS, através de medidas de absorbância, pode ser utilizado com muita eficiência para prever o comportamento desse grupo de micro-organismos (BAL) em diferentes produtos cárneos.

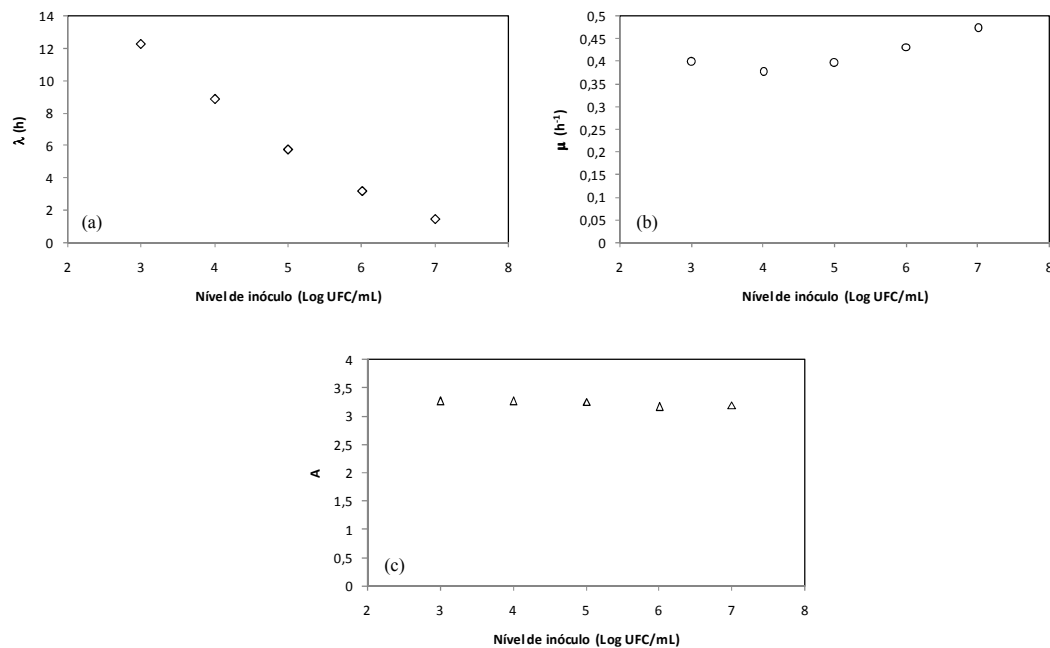


Figura 4.1: Valores dos parâmetros de crescimento calculados a partir dos dados de absorbância a diferentes níveis de inóculo (Log UFC/mL) de *L. plantarum* em MRS a 30°C. (a): λ (h) (\diamond), (b): μ (h^{-1}) (\circ) e (c): A (Δ).

Este primeiro artigo teve como objetivo estudar o crescimento de *L. plantarum*, *L. viridescens* e *L. sakei* em diferentes temperaturas de incubação (variando de 4 a 30°C), e comparar o ajuste de quatro modelos primários usados para descrever as curvas de crescimento destes micro-organismos. Foi realizada também a comparação de diferentes modelos secundários para descrever a influência da temperatura nos parâmetros de crescimento (λ , μ e A), obtidos pelo melhor modelo primário. A comparação estatística dos modelos primários e secundários foi realizada através dos índices R^2 , MSE, fator bias e exatidão. As equações obtidas pelos modelos secundários permitirão a predição das BAL sob diferentes condições dentro do intervalo de temperatura estudado. Estas BAL foram selecionadas por fazerem parte das principais bactérias deteriorantes dos produtos cárneos refrigerados, embalados a vácuo e em atmosfera modificada.

Na parte final do capítulo, após a apresentação do artigo, estão incluídas algumas informações complementares referentes à comparação dos modelos secundários pelos índices estatísticos, às análises de pH realizadas durante os experimentos com *L. plantarum* em diferentes temperaturas e à comparação do crescimento deste micro-organismo com o decréscimo do pH ao longo do tempo.

4.1.1 Artigo 1: Modeling of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus viridescens* and *Lactobacillus sakei* growth at different temperatures

Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) are the main microorganisms group responsible for the spoilage of refrigerated vacuum-packaged meat products, such as ham, sausage, chicken breast, among others. In this study, four primary growth models (Gompertz, Logistic, modified Logistic, and Baranyi-Roberts) were compared using the indices R^2 , MSE, bias, and accuracy factor. The Gompertz model presented the best fit and was used for obtaining the growth parameters (lag phase duration (λ), maximum specific growth rate (μ), and microbial population increase (A)) for *L. plantarum*, *L. viridescens* and *L. sakei* at six growth temperatures (4, 8, 12, 16, 20 and 30°C). To describe the effect of the storage temperature on the growth parameters, five secondary models were investigated, i.e., linear, square root, Arrhenius-type, exponential and power equations. The effect of temperature on the lag phase duration (λ) in general was better described by the power equation, the square root was the best model for the maximum specific growth rate (μ), while the Arrhenius-type equation was chosen for the microbial population increase (A). These equations allowed the prediction of LAB growth curves, which are the main spoilage microorganisms of meat products, under different temperatures.

Keywords: lactic acid bacteria, predictive modeling, temperature.

1. Introduction

Lactic acid bacteria group (LAB) was identified as the main spoilage population of vacuum-packaged and modified atmosphere meat products, and other processed products stored under refrigeration temperatures. The most frequent strains of LAB in meats and meat products are: *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Carnobacterium piscicola*, *Carnobacterium divergens* (Hugas, 1998). The spoilage caused by LAB is primarily due to the production of metabolites, which cause undesirable alterations in appearance, texture and flavor, producing unpleasant odors and flavors, along with the discoloring and slime production on the product's surface (Samelis et al., 2000).

Temperature seems to be the most important factor that influences food spoilage as well as safety. Hence, cold chain control is very important to avoid rapid and uncontrollable microbial growth, which reduce product shelf-life and may endanger public health (Nychas et al., 2008).

The continuous progress of science and technology of food preservation involves the development of new food microbiology tools. The need of assuring microbiological safety and high quality foods has been stimulating the application of predictive microbiology tools. Predictive microbiology basically focuses on the development of mathematical models to describe the growth of pathogens and spoilage microorganisms in food, helping predicting food shelf-life (Nakashima et al., 2000; Brul et al., 2008).

The so-called primary growth models are those that describe the behavior of microorganisms during storage time (Whiting, 1995). They use three parameters in the characterization of bacterial growth curve, i.e., the lag phase duration (λ), the maximum specific growth rate (μ), and the microbial population increase (A). Primary models such as Gompertz, Logistic, modified Logistic, and Baranyi-Roberts models are often used for fitting microbial growth data (Buchanan et al., 1997; Erkmen and Alben, 2002; Corradini and Peleg, 2005; Pal et al., 2008).

Secondary models are equations that describe how the growth parameters obtained from a primary model vary with one or more environmental factors such as temperature, pH, water activity and others (Whiting 1995; Geeraerd et al., 2004). Apart from the square root and Arrhenius-type models, generally used in literature, the influence of temperature on microbial growth parameters can be described by other empirical equations such as exponential, polynomial, linear, and power (Labuza and Fu, 1993; McMeekin and Ross, 2002; Cayré et al., 2003; Corradini and Peleg, 2005; Gil et al., 2006).

The goodness-of-fit of primary and secondary models are classically given by the correlation coefficient (R^2), the mean square error (MSE), bias, and accuracy factor (Ross, 1996; Zhou et al., 2008; Slongo et al., 2009).

The main of this study was to independently research *L. plantarum*, *L. sakei* and *L. viridescens* growth at different temperatures (4, 8, 12, 16, 20 and 30°C), comparing the ability of the aforementioned primary models (Gompertz, Logistic, modified Logistic, and Baranyi-Roberts) to describe the growth curves. Besides, comparing the performance of different secondary models to describe the influence of temperature on

the λ , μ , and A growth parameters of the better primary model was also aimed for.

2. Materials and methods

2.1. Strain and growth medium

Lactobacillus plantarum (ATCC 8014), *Lactobacillus sakei* (ATCC 15521) and *Lactobacillus viridescens* (ATCC 12706) were grown in MRS (Man, Rogosa and Sharpe) - *Lactobacillus* broth (Acumedia, Inc. Lansing, Michigan, USA). Strains were stored in MRS broth containing 20% glycerol at -24°C until utilization.

2.2. Growth conditions

The inoculums were grown for 18 h in MRS broth at 30°C. After this period, the inoculums were used to determine microbial growth curves at different temperatures: 4 and 8°C (refrigeration temperature), 12, 16 and 20°C (temperature abuse) and 30°C (optimum bacterial growth temperature). Experiments were carried out in 160 mL of MRS broth with 1% (v/v) of inoculum in 250 mL Erlenmeyer flasks. The initial pH was adjusted at 6. The flasks were maintained in an incubator (Dist, Florianópolis, Brazil) and the microbial growth evolution was determined until the stationary stage. For each LAB, at each tested temperature, four growth curves were generated: two duplicates at two different days (independent trials). The exception was the *L. sakei*, for which two curves were generated at 16°C, 20°C and 30°C.

2.2.1 Sampling

Samples of 2 mL were collected aseptically in a laminar flow device (CFLV-09, Veco, Campinas, Brazil) at predetermined intervals, depending on the temperature of growth. LAB growth was determined by absorbance (abs) at 600 nm wavelength in a spectrophotometer (1105, Bel Photonics, Monza, Italy). The pH was measured by a pHmeter (V620, Analion, Ribeirão Preto, Brazil). The growth curves were followed until the stationary phase was achieved, and were obtained by plotting $\ln(\text{abs}/\text{abs}_0)$ versus time. The term abs represents the absorbance at time t and abs_0 the initial absorbance.

2.3. Modeling *L. plantarum*, *L. sakei* and *L. viridescens* growth at various temperatures

2.3.1 Primary models

The primary models (Gompertz, Logistic, modified Logistic, and Baranyi-Roberts) were fit to LAB growth curves. Table 1 shows the equations representing each primary model. The growth curves were fitted using Matlab 7 software (MathWorks™, Natick, MA, USA) with Gompertz, Logistic and modified Logistic models, and DMfit program - Baranyi and Roberts (1994) - (Excel add-in) to Baranyi-Roberts model.

Table 1. Primary growth models used to fit the growth of LAB.

Primary models	Equations ^a
Gompertz	$\ln\left(\frac{abs}{abs_0}\right) = A \cdot \exp\{-\exp[-B \cdot (t - M)]\}$ $\mu = \frac{A \cdot B}{e} \quad \lambda = M - \frac{1}{B}$
Logistic	$\ln\left(\frac{abs}{abs_0}\right) = \frac{A}{[1 + \exp[-B \cdot (t - M)]]}$ $\mu = \frac{A \cdot B}{4} \quad \lambda = \frac{(M - 2)}{B}$
Modified Logistic	$\ln\left(\frac{abs}{abs_0}\right) = \frac{A}{(1 + \exp[-B \cdot (t - M)])} - \frac{A}{(1 + \exp(M \cdot B))}$ $\mu = \frac{A \cdot B}{4} \quad \lambda = \frac{(M - 2)}{B}$
Baranyi-Roberts	$abs = abs_0 + \mu \cdot F(t) - \frac{1}{m} \ln\left(1 + \frac{\exp(m \cdot \mu \cdot F(t)) - 1}{\exp(m \cdot (abs_{max} - abs_0))}\right)$ $F(t) = t + \frac{1}{\mu} \ln(\exp(-\mu \cdot t) + \exp(-\mu \cdot \lambda) - \exp(-\mu(t + \lambda)))$

^a $\ln(abs/abs_0)$: is the logarithm of the cell density at time t ; abs : absorbance at time t ; abs_0 : initial absorbance; A is the logarithmic microbial population increase; μ : maximum specific growth rate (h^{-1}); λ : lag phase duration (h); B is the relative growth rate at time M (h^{-1}), and M is the time required to reach the maximum rate growth (h); abs_{max} : maximum absorbance, m is the curvature parameter; $e = 2.7182$.

2.3.2 Secondary models

Five secondary models were compared in order to select the best model to describe the influence of temperature on λ , μ , and A parameters. Table 2 shows these secondary models. The curves were fitted using Matlab 7 software.

Table 2. Secondary models used to describe the influence of temperature on the growth parameters of LAB.

Secondary models	Equation ^a
Linear	$k = b + rT$
Square root	$k^{1/2} = b(T - T_{\min})$
Arrhenius-type	$\ln k = a\left(\frac{1}{T}\right) + b$
Power	$k = b.T^n$
Exponential	$k = a.\exp(bT)$

^a k: represents the growth parameter of interest (μ , λ or A); T: is the temperature ($^{\circ}\text{C}$); T_{\min} : is the minimum temperature for growth or model coefficient; a, b, r, n: are the model coefficients.

2.4. Statistical analysis

Mathematical primary or secondary models comparisons were performed using the statistical indices: correlation coefficient (R^2), mean square error (MSE), bias factor, and factor accuracy. These statistical indices are shown in Table 3. The smaller the MSE value, the better the model is to fit the data. The bias factor is used for estimating the average difference between predicted and observed values. The accuracy factor provides a measurement of the average absolute difference between predicted and observed values (Sutherland et al., 1994; Ross, 1996).

Table 3. Statistical indices for comparison of the models.

Statistical indices	Equation ^a
MSE	$\text{MSE} = \frac{\sum (\text{Value}_{\text{observed}} - \text{Value}_{\text{predicted}})^2}{n - p}$
Bias factor	$\text{bias factor} = 10^{\left(\sum \frac{\log(\text{Value}_{\text{predicted}} / \text{Value}_{\text{observed}})}{n} \right)}$
Accuracy factor	$\text{accuracy factor} = 10^{\left(\sum \frac{ \log(\text{Value}_{\text{predicted}} / \text{Value}_{\text{observed}}) }{n} \right)}$

^a n: number of experimental data; p: number of model parameters.

3. Results and discussion

Primary growth models

Tables 4, 5 and 6 show the range of statistical indices values obtained for primary models for the six growth temperatures, for *L. plantarum*, *L. viridescens* and *L. sakei*, respectively. The range represents the lowest and the highest indices values obtained by fitting the models to the four replicate growth curves, at each investigated temperature, except for *L. sakei* at 16, 20 and 30°C, for which only two curves were available. The calculated statistical indices showed that all models represented well the growth behavior of these LAB. However, visual analysis of these fittings (data not presented) showed that the Logistic and Baranyi-Roberts models did not describe well the lag phase of growth curves for various investigated situations. The fittings of the Baranyi-Roberts model were performed by the DMfit program, using the default values of $n_{\text{Curv}} = 1$ and $m_{\text{Curv}} = 10$. These values are the curvature parameters, representing the beginning and the end of the linear phase, respectively.

Table 4. Range of statistical indices values for Gompertz, Logistic, modified Logistic, and Baranyi-Roberts models, obtained by fitting the growth curves of *L. plantarum* at six temperatures.

Temperature/ Indices	Models			
	Gompertz	Logistic	Modified Logistic	Baranyi
30°C				
R ²	0.998-0.999	0.993-0.997	0.997-0.999	0.990-0.993
MSE	0.003-0.006	0.012-0.022	0.007-0.011	0.017-0.023
Bias	0.997-1.002	0.978-0.985	0.988-0.995	1.016-1.038
Accuracy	1.036-1.056	1.087-1.121	1.058-1.078	1.045-1.087
20°C				
R ²	0.996-0.998	0.992-0.993	0.994-0.997	0.990-0.992
MSE	0.005-0.011	0.018-0.022	0.008-0.016	0.015-0.023
Bias	0.995-0.998	0.978-0.981	0.985-0.989	1.029-1.063
Accuracy	1.055-1.074	1.101-1.123	1.066-1.098	1.086-1.103
16°C				
R ²	0.997-0.998	0.993-0.994	0.995-0.996	0.988-0.997
MSE	0.005-0.007	0.012-0.014	0.008-0.011	0.005-0.023
Bias	1.000-1.002	0.981-0.984	0.988-0.991	0.971-1.052
Accuracy	1.052-1.072	1.096-1.130	1.078-1.115	1.069-1.098
12°C				
R ²	0.994-0.999	0.987-0.994	0.992-0.997	0.982-0.994
MSE	0.002-0.013	0.014-0.028	0.008-0.018	0.013-0.025
Bias	0.994-0.996	0.976-0.982	0.983-1.001	1.054-1.095
Accuracy	1.040-1.093	1.102-1.142	1.073-1.111	1.104-1.143
8°C				
R ²	0.993-0.999	0.990-0.996	0.982-0.997	0.992-0.998
MSE	0.001-0.009	0.004-0.014	0.002-0.010	0.002-0.010
Bias	0.999-1.002	0.985-0.988	0.993-0.995	1.021-1.053
Accuracy	1.022-1.065	1.054-1.088	1.038-1.066	1.051-1.082
4°C				
R ²	0.991-0.993	0.989-0.992	0.991-0.994	0.990-0.993
MSE	0.002-0.004	0.002-0.003	0.002-0.003	0.002-0.003
Bias	0.999-1.002	0.995-0.997	1.003-1.006	0.991-1.047
Accuracy	1.036-1.048	1.035-1.044	1.032-1.044	1.074-1.185

Table 5. Range of statistical indices values for Gompertz, Logistic, modified Logistic, and Baranyi-Roberts models, obtained by fitting the growth curves of *L. viridescens* at six temperatures.

Temperature/ Indices	Models			
	Gompertz	Logistic	Modified Logistic	Baranyi
30°C				
R ²	0.998-0.999	0.995-0.999	0.996-0.999	0.992-0.998
MSE	0.003-0.004	0.002-0.009	0.001-0.007	0.004-0.012
Bias	1.002-1.015	0.985-0.993	0.990-0.998	0.945-1.033
Accuracy	1.039-1.047	1.034-1.045	1.026-1.065	1.063-1.100
20°C				
R ²	0.998-0.999	0.994-0.999	0.996-0.999	0.989-0.997
MSE	0.002-0.004	0.003-0.015	0.002-0.011	0.004-0.023
Bias	0.999-1.012	0.981-0.992	0.988-0.998	0.949-1.041
Accuracy	1.039-1.052	1.042-1.113	1.036-1.088	1.075-1.098
16°C				
R ²	0.994-0.998	0.997-0.999	0.997-0.999	0.994-0.997
MSE	0.003-0.010	0.001-0.005	0.001-0.005	0.003-0.007
Bias	0.997-1.027	0.982-1.005	0.985-1.013	0.966-1.003
Accuracy	1.042-1.075	1.030-1.051	1.022-1.055	1.033-1.091
12°C				
R ²	0.994-0.999	0.986-0.997	0.989-0.998	0.976-0.996
MSE	0.001-0.010	0.003-0.022	0.002-0.016	0.005-0.029
Bias	0.993-1.004	0.981-0.988	0.987-0.994	0.985-1.037
Accuracy	1.022-1.076	1.049-1.127	1.036-1.095	1.081-1.228
8°C				
R ²	0.998-0.999	0.994-0.998	0.996-0.998	0.991-0.996
MSE	0.001-0.002	0.003-0.006	0.002-0.004	0.004-0.008
Bias	0.999-1.005	0.986-0.992	0.991-0.997	1.004-1.066
Accuracy	1.024-1.035	1.041-1.062	1.032-1.052	1.033-1.111
4°C				
R ²	0.995-0.997	0.992-0.998	0.996-0.998	0.990-0.998
MSE	0.001-0.002	0.001-0.003	0.001-0.003	0.001-0.003
Bias	1.000-1.007	0.992-0.997	0.997-1.003	0.964-1.010
Accuracy	1.029-1.045	1.023-1.044	1.018-1.044	1.077-1.160

Table 6. Range of statistical indices values for Gompertz, Logistic, modified Logistic, and Baranyi-Roberts models, obtained by fitting the growth curves of *L. sakei* at six temperatures.

Temperature/ Indices	Models			
	Gompertz	Logistic	Modified Logistic	Baranyi
30°C				
R ²	0.997-0.998	0.990-0.992	0.996-0.997	0.991-0.994
MSE	0.004-0.006	0.015-0.017	0.006-0.008	0.009-0.013
Bias	0.993-0.994	0.978-0.979	0.987-0.988	1.056-1.067
Accuracy	1.051-1.061	1.101-1.107	1.059-1.070	1.096-1.117
20°C				
R ²	0.997-0.998	0.989-0.991	0.996-0.997	0.995-0.996
MSE	0.003-0.005	0.015-0.018	0.005-0.006	0.006-0.007
Bias	0.989-0.990	0.972-0.973	0.983-0.984	1.044-1.045
Accuracy	1.049-1.056	1.114-1.117	1.057-1.059	1.193-1.217
16°C				
R ²	0.995-0.996	0.986-0.987	0.995-0.996	0.989-0.990
MSE	0.005-0.006	0.018-0.019	0.005-0.006	0.013-0.014
Bias	0.990-0.991	0.979-0.980	0.987-0.988	0.944-1.062
Accuracy	1.062-1.064	1.118-1.120	1.058-1.062	1.109-1.111
12°C				
R ²	0.996-0.997	0.988-0.996	0.998-0.999	0.995-0.998
MSE	0.003-0.004	0.005-0.013	0.002-0.003	0.002-0.006
Bias	0.991-1.000	0.979-0.983	0.993-1.001	0.984-1.053
Accuracy	1.045-1.055	1.058-1.101	1.032-1.041	1.068-1.102
8°C				
R ²	0.994-0.998	0.992-0.995	0.996-0.997	0.991-0.994
MSE	0.001-0.003	0.003-0.006	0.002-0.003	0.004-0.005
Bias	0.996-1.003	0.984-0.994	0.990-1.001	1.010-1.084
Accuracy	1.030-1.045	1.043-1.069	1.031-1.044	1.081-1.113
4°C				
R ²	0.985-0.994	0.987-0.994	0.987-0.996	0.987-0.997
MSE	0.002-0.004	0.002-0.003	0.001-0.004	0.001-0.003
Bias	1.001-1.002	0.995-0.999	1.006-1.010	0.977-1.023
Accuracy	1.034-1.049	1.032-1.044	1.029-1.046	1.094-1.158

As it can also be observed in Tables 4, 5 and 6, statistical indices of the Logistic and Baranyi-Roberts models are slightly lower than the values observed for Gompertz and modified Logistic models, with a slightly superior performance for the Gompertz model, which was the only one that showed correlation coefficients above 0.99, for all temperatures. The lowest values of the mean square error were observed for the Gompertz model. Bias and accuracy factors closer to 1 were also obtained for the Gompertz model.

Through analysis of the statistical indices, the primary model that showed the best fit to growth curves of *L. plantarum*, *L. viridescens* and *L. sakei*, at all investigated temperatures, was the Gompertz model. Therefore, this model was chosen for the

calculation of the growth parameters of LAB. These results match those reported by Slongo et al. (2009) who studied the influence of pressure level and holding time during high pressure treatment of ham on LAB growth in vacuum-packaged sliced ham. These authors reported that both modified Gompertz and Logistic models were able to describe microbial growth in ham. However, Gompertz model had a slightly superior performance. Zwietering et al. (1990) compared several sigmoidal functions (Logistic, Gompertz, Richards, Schnute, and Stannard models) for describing *L. plantarum* growth curves in MRS broth at different temperatures (6°C to 42.8°C). These authors concluded that all growth curves were better fitted with the Gompertz model.

Figures 1, 2 and 3 shows the growth curves of *L. plantarum*, *L. viridescens* and *L. sakei*, respectively, at six different temperatures, fitted by the Gompertz model. Each temperature is exemplified by only one curve in each cultivation condition. It can be observed that the model describes well all the growth curves. Analyzing these figures, it is possible to verify the behavior of the three LAB in each storage condition, and that the temperature decrease causes the increase of the lag phase, and the decrease of the maximum specific growth rate and of the maximum population. The three strains had a very similar behavior. They just showed little difference on the curves at 20°C and 16°C of *L. viridescens*, for which the growth curves were very similar, a behavior not observed for the other two strains.

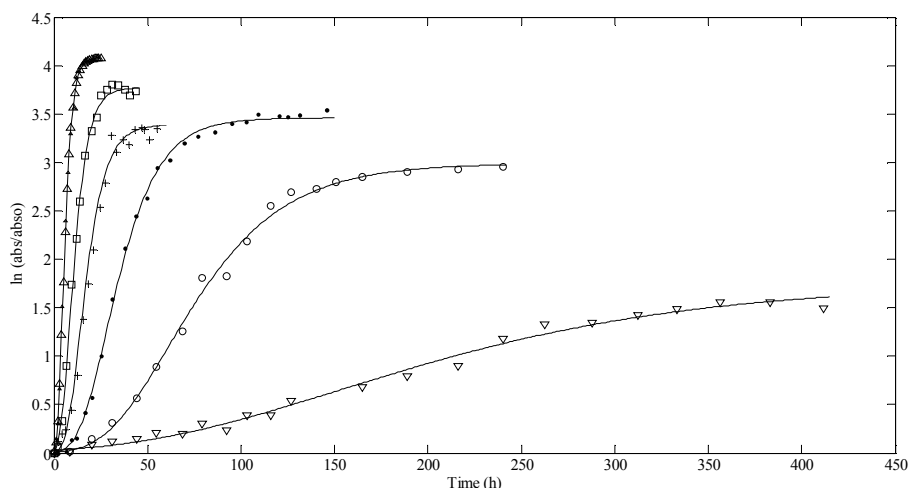


Figure 1. Example of *L. plantarum* growth curves in MRS broth at different temperatures. The lines represent the Gompertz model fit to experimental data (symbols). (∇) 4°C, (\circ) 8°C, (\bullet) 12°C, ($+$) 16°C, (\square) 20°C and (Δ) 30°C.

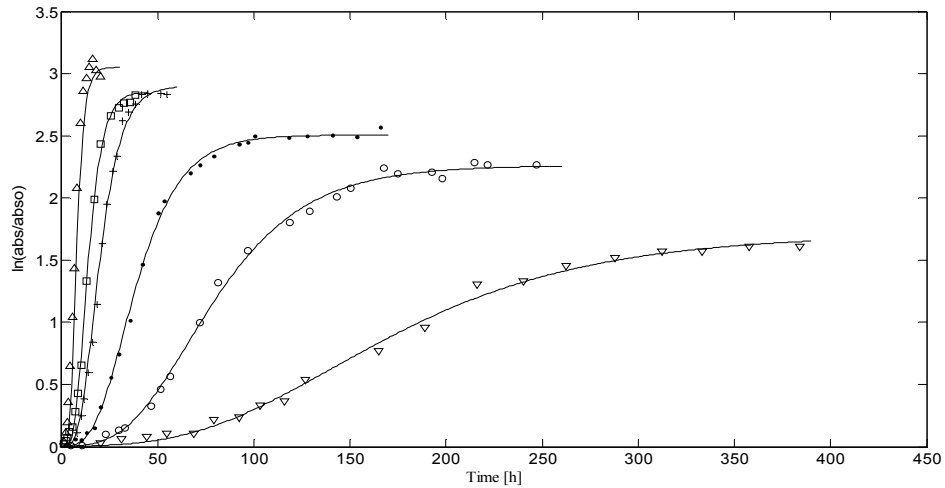


Figure 2. Example of *L. viridescens* growth curves in MRS broth at different temperatures. The lines represent the Gompertz model fit to experimental data (symbols). (∇) 4°C, (\circ) 8°C, (\bullet) 12°C, (+) 16°C, (\square) 20°C and (Δ) 30°C.

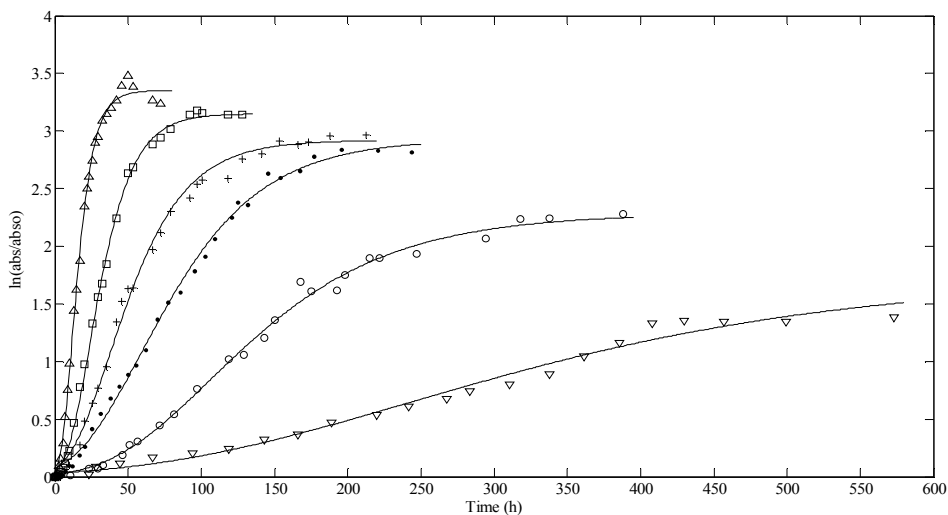


Figure 3. Example of *L. sakei* growth curves in MRS broth at different temperatures. The lines represent the Gompertz model fit to experimental data (symbols). (∇) 4°C, (\circ) 8°C, (\bullet) 12°C, (+) 16°C, (\square) 20°C and (Δ) 30°C.

In real storage and commercialization of foodstuffs, it is known that temperature fluctuations can occur. The results showed that small increases in temperature (variation of 4°C) interfered in all growth parameters. This way, it emphasizes the importance of controlling the chill chain, especially for refrigerated meat products that have a relatively short shelf-life, compared with other food products.

Secondary models

In this study, five mathematical equations were evaluated to represent the secondary models: linear, square root, Arrhenius-type, power, and exponential. These models describe how temperature (between 4 and 30°C) influences *L. plantarum*, *L. viridescens* and *L. sakei* growth parameters. These equations were fitted to the Gompertz growth parameters (λ , μ and A) and compared by the statistical indices R^2 , MSE, bias, and accuracy factor (data not shown). Figure 4 a, b and c, displays the best fit shown by the selected secondary models for λ (power equation), μ (square root model), and for A (Arrhenius-type equation), respectively. The standard deviations shown by each growth parameter, for each temperature, are also seen in that figure. It is possible to observe that there are small standard deviations for all parameters. All secondary models, for the three microorganisms, are shown in Table 7. The models have shown good correlation coefficients. So, it is possible to predict the *L. plantarum*, *L. viridescens* and *L. sakei* growth parameters in the temperature range studied in this research (4°C to 30°C). Although the experiments were developed in culture media, these models could be helpful in the food industry, allowing for a better understanding of the behavior of the strains in meat products.

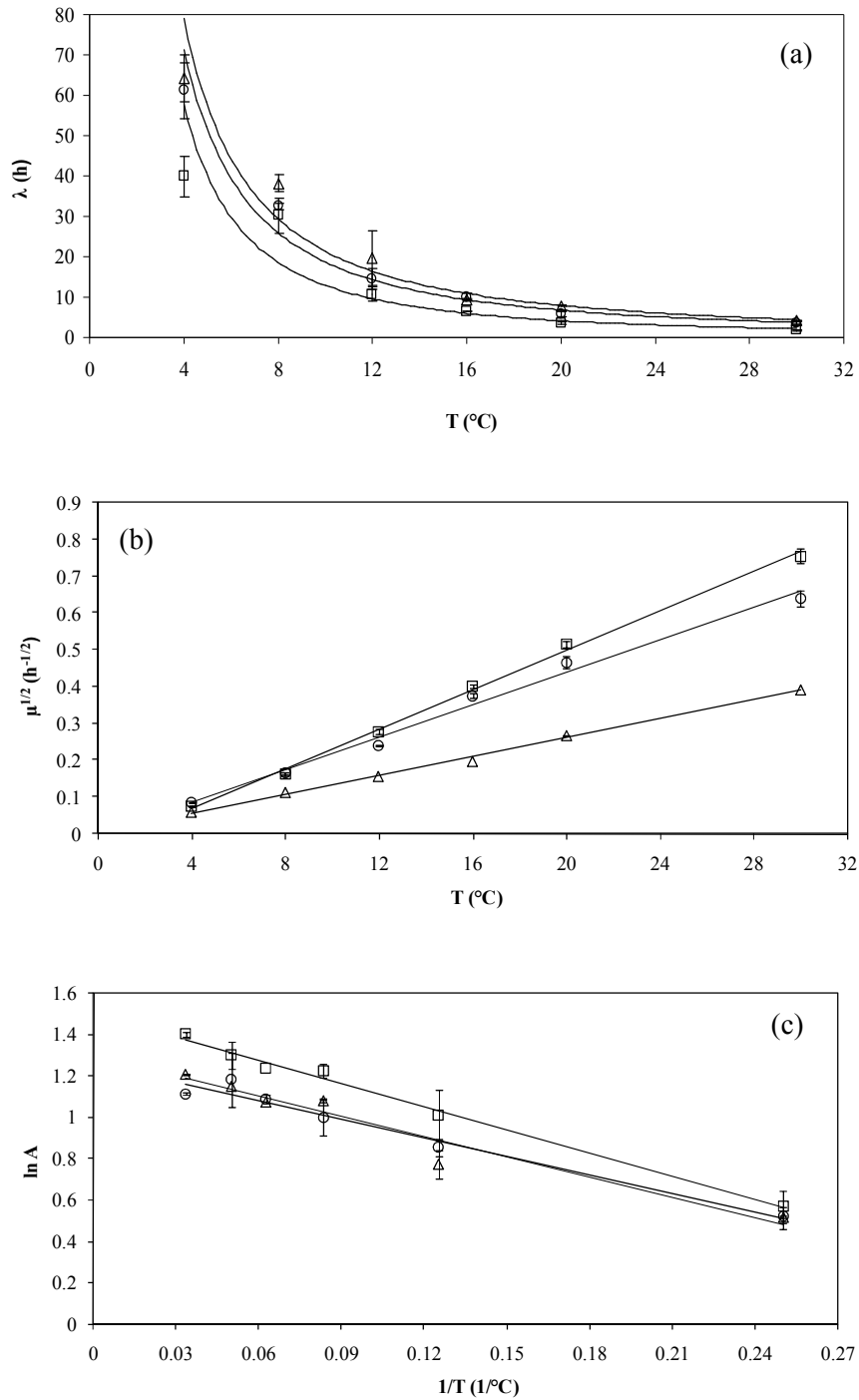


Figure 4. Temperature effect on the LAB growth parameters. (a) λ - power equation; (b) μ - square root model; (c) A - Arrhenius-type equation. The lines represent the secondary model fit to parameters growth (symbols). Bars show the standard deviation. (□) *Lactobacillus plantarum*, (○) *Lactobacillus viridescens* and (Δ) *Lactobacillus sakei*.

Table 7. Secondary models for *L. plantarum*, *L. viridescens* and *L. sakei* growth parameters.

LAB/Parameters	Equation	R ²
<i>L. plantarum</i>		
λ (h)	$\lambda = 558.61*(T)^{-1.636}$	0.9391
μ (h ⁻¹)	$\mu^{1/2} = 0.0268*(T) - 0.0371$	0.9974
A	$\ln(A) = -3.755*(1/T) + 1.4981$	0.9920
<i>L. viridescens</i>		
λ (h)	$\lambda = 544.15*(T)^{-1.465}$	0.9821
μ (h ⁻¹)	$\mu^{1/2} = 0.0221*(T) - 0.0022$	0.9889
A	$\ln(A) = -2.9968*(1/T) + 1.2584$	0.9702
<i>L. sakei</i>		
λ (h)	$\lambda = 572.63*(T)^{-1.429}$	0.9675
μ (h ⁻¹)	$\mu^{1/2} = 0.0129*(T) + 0.0034$	0.9957
A	$\ln(A) = -3.2682*(1/T) + 1.2935$	0.9473

An analysis of the secondary models was performed accordingly for the three LAB, leading to just one model to represent the influence of temperature on each growth parameter. In general, the influence of temperature variation on the lag was better fitted by the power equation, still the exponential equation has shown a correlation coefficient of 0.95 for *L. plantarum* (data not shown). For the μ parameter, the influence of temperature was better described by the square root model. For the logarithmic increase of population (A), the Arrhenius-type equation showed the best fittings for the three LAB.

The results obtained in this study are in agreement with results reported by the literature. Corradini and Peleg (2005) demonstrated that the influence of temperature on microbial growth parameters can be described by other empirical equations such as the exponential, type-Arrhenius, polynomial, linear, and power models. The square root equation is probably the most studied and widely used model to analyze the effect of temperature on specific microbial growth rate. Cayré et al. (2003) investigated the effect of three temperatures (0°C, 8°C and 15°C) on LAB growth in cooked meat emulsions packaged in films with low oxygen permeability. The Arrhenius-type and square root

models were able to describe the effect of the different temperatures on μ parameter, but the square root model had a slightly superior performance.

4. Conclusions

The primary model that showed the best fit to growth curves of *L. plantarum*, *L. viridescens* and *L. sakei* at temperatures ranging from 4°C to 30°C was the Gompertz model. It is possible to conclude that the growth of LAB is strongly influenced by storage temperature, even under refrigeration conditions. The influence of temperature variation on the lag phase was best fitted by the power equation. For the μ parameter, this influence was best described by the square root model. For the logarithmic increase of population, the Arrhenius-type equation provided the best fits.

The shelf-life of a food product can be drastically reduced by temperature fluctuations and by temperature abuse, i.e., use of storage temperatures above the recommended for a given foodstuff. It is known that fluctuations and temperature abuse can occur in the industry, during distribution and storage in supermarkets and small retail stores. The selected equations allow for predicting the growth of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus viridescens* and *Lactobacillus sakei* under different storage temperature. As these bacteria are the main responsible for the spoilage of vacuum-packaged meat products, these models could be helpful for investigating the shelf-lives of these products, even under non-isothermal conditions. This will be the focus of a future paper.

Acknowledgments

Financial support provided by CAPES-Brazil is gratefully acknowledged.

References

- Baranyi, J., Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.
- Brul, S., Mensorides, F.I.C., Hellingwerf, K.J., Mattos, M.J.T. 2008. Microbial systems biology: new frontiers open to predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology* 128, 16-21.

- Buchanan, R.L., Whiting, R.C., Damert, W.C. 1997. When is simple good enough: A comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiology* 14, 313-326.
- Cayré, M.E., Vignolo, G., Garro, O. 2003. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsion stored at three temperatures. *Food Microbiology* 20, 561-566.
- Corradini, M.G., Peleg, M. 2005. Estimating non-isothermal bacterial growth in foods from isothermal experiments data. *Journal of Applied Microbiology* 99, 187-200.
- Erkmen, O., Alben, E. 2002. Mathematical modeling of citric acid production and biomass formation by *Aspergillus niger* in undersized semolina. *Journal of Food Engineering* 52, 161-166.
- Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., Devlieghere, F., Bernaert, H., Debevere, J., Van Impe, J.F. 2004. Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling. *International Journal of Food Microbiology* 91, 229-244.
- Gil, M.M., Brandão, T.R.S., Silva, C.L.M. 2006. A modified Gompertz model to predict microbial inactivation under time-varying temperature conditions. *Journal of Food Engineering* 76, 89-94.
- Hugas, M. 1998. Bacteriocinogenic lactic bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science* 49, 139-150.
- Labuza, T.P., Fu, B. 1993. Growth kinetics for shelf-life prediction: theory and practice. *Journal of Industrial Microbiology* 12, 309-323.
- McMeekin, T.A., Ross, T. 2002. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology* 78, 133-153.
- Nakashima, S.M.K., André, C.D.S., Franco, B.D.G.M. 2000. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. *Brazilian Journal of Food Technology* 3, 41-51.
- Nychas, G.J.E., Skandamis, P.N., Tassou, C.C., Koutsoumanis, K.P. 2008. Meat spoilage during distribution. *Meat Science* 78, 77-89.
- Pal, A., Labuza, T.P., Diez-Gonzalez, F. 2008. Comparison of primary predictive models to study the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperature in liquid cultures and selection of fastest growing ribotypes in meat and turkey product slurries. *Food Microbiology* 25, 460-470.

- Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology* 81, 501-508.
- Samelis, J., Kakouri, A., Rementzis, J. 2000. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *Food Microbiology* 17, 329-340.
- Slongo, A.P., Rosenthal, A., Camargo, L.M.Q., Deliza, R., Mathias, S.P., Aragão, G.M.F. 2009. Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. *LWT-Food Science and Technology* 42, 303-306.
- Sutherland, J.P., Bayliss, A.J., Roberts, T.A. 1994. Predictive modeling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology* 21(3), 217-236.
- Whiting, R.C. 1995. Microbial modelling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35, 467-494.
- Zhou, K., Cui, T.T., Li, P.L., Liang, N.J., Liu, S.C., Ma, C.W., Peng, Z.H. 2008. Modelling and predicting the effect of temperature, water activity and pH on growth of *Streptococcus iniae* in Tilapia. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1956-1965.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Riet, K.V. 1990. Modeling of bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1875-1881.

4.1.2 Informações complementares

A escolha do modelo secundário foi baseada na comparação dos coeficientes de correlação (R^2), obtidos pelos ajustes dos cinco modelos secundários, como apresentado na Tabela 4.1, para as três BAL estudadas.

Tabela 4.1. Coeficientes de correlação (R^2) obtidos pelos ajustes dos modelos secundários que descrevem a influência da temperatura nos parâmetros de crescimento λ (h), μ (h^{-1}) e A de *L. plantarum*, *L. viridescens* e *L. sakei*.

BAL/ Modelos secundários	Coeficiente de correlação (R^2)		
	λ	μ	A
<i>Lactobacillus plantarum</i>			
Linear	0,7452	0,9481	0,8028
Raiz Quadrada	0,8494	0,9974	0,7580
Tipo Arrhenius	0,7496	0,9249	0,9920
Potência	0,9377	0,9973	0,9262
Exponencial	0,9500	0,8862	0,7115
<i>Lactobacillus viridescens</i>			
Linear	0,6896	0,9644	0,6644
Raiz Quadrada	0,8154	0,9889	0,6493
Tipo Arrhenius	0,8496	0,9032	0,9727
Potência	0,9821	0,9931	0,8835
Exponencial	0,9312	0,8981	0,6312
<i>Lactobacillus sakei</i>			
Linear	0,7317	0,9335	0,7864
Raiz Quadrada	0,8404	0,9957	0,7607
Tipo Arrhenius	0,8158	0,8945	0,9473
Potência	0,9676	0,9956	0,9293
Exponencial	0,9372	0,9273	0,7342

Pela análise da Tabela 4.1, apesar da equação exponencial para *L. plantarum* apresentar um R^2 maior que o modelo da potência, este último foi selecionado por apresentar melhor ajuste para as outras duas BAL. Para o parâmetro μ , o modelo da raiz quadrada e da potência apresentaram coeficientes de correlação muito próximos, por isso foi realizada a análise dos índices MSE, fator bias e fator exatidão, para a comparação destes dois modelos (Tabela 4.2). Para o parâmetro A, os melhores coeficientes de correlação foram obtidos pelo ajuste do modelo do tipo Arrhenius, para as três BAL.

Tabela 4.2. Valores dos índices estatísticos para os modelos da raiz quadrada e potência, ajustados aos valores de μ (h^{-1}) de *L. plantarum*, *L. viridescens* e *L. sakei* em função da temperatura.

BAL/ Índices Estatísticos	Modelos secundários	
	Raiz Quadrada	Potência
<i>Lactobacillus plantarum</i>		
R ²	0,9974	0,9973
MSE	0,0003	0,0009
Bias	1,0005	0,9226
Exatidão	1,0424	1,0995
<i>Lactobacillus viridescens</i>		
R ²	0,9889	0,9931
MSE	0,0008	0,0007
Bias	1,0094	0,9864
Exatidão	1,0524	1,1103
<i>Lactobacillus sakei</i>		
R ²	0,9957	0,9956
MSE	0,0001	0,0005
Bias	0,9944	0,8272
Exatidão	1,0385	1,2088

Como observado na Tabela 4.2 o modelo da raiz quadrada apresentou os valores de MSE mais próximos a zero, bem como os valores dos fatores bias e exatidão mais próximos a 1. Em função disto, o modelo da raiz quadrada foi selecionado para descrever a influência da temperatura na velocidade de crescimento das BAL.

A Tabela 4.3 apresenta os valores dos parâmetros de crescimento observados e preditos pelos modelos secundários obtidos para *L. plantarum*, *L. viridescens* e *L. sakei*. Para avaliar a predição dos modelos secundários foram calculados os fatores bias e exatidão para os três modelos secundários (Tabela 4.3). Neste caso, não foram calculados os valores de MSE porque, em algumas temperaturas para o modelo da fase lag, as diferenças entre os valores observados e preditos foram altas, em valores absolutos (exemplo a 8°C para *L. viridescens* o valor predito foi de 25,9 h enquanto observou-se 32,5 h). Quando esta diferença é elevada ao quadrado, o valor final de MSE se torna muito elevado, mesmo que seja observado em apenas alguns pontos a maior diferença na predição. Segundo Nau (2010) o índice estatístico MSE ou o RMSE são mais sensíveis do que outras medidas aos grandes erros ocasionais, pois o processo de elevação ao quadrado fornece peso desproporcional aos erros muito grandes e se um erro grande ocasional não é um problema na situação estudada, estes índices não são

critérios adequados para avaliar a capacidade de ajuste do modelo.

Analisando-se o fator bias calculado entre os valores observados e preditos para o parâmetro λ para as três BAL, observa-se que para *L. viridescens* e *L. sakei* os valores são muito próximos a 1 (0,999) e que para *L. plantarum* este valor foi um pouco inferior (0,988). O fator exatidão apresentou aproximadamente 11% a 26% de variação entre os valores observados e preditos para as três BAL. Para o parâmetro μ , o modelo que apresentou menor valor de bias foi para *L. sakei* (0,889). Com relação aos valores do fator exatidão, estes variaram de 10% a 15%. Para o parâmetro A todos os valores de bias são próximos a 1, bem como o fator exatidão.

As Figuras 4.2, 4.3 e 4.4 apresentam os valores observados vs valores preditos pelos modelos secundários para os três parâmetros de crescimento de *L. plantarum*, *L. viridescens* e *L. sakei*, respectivamente. Pela análise das figuras, é possível perceber que, em geral, os valores preditos e observados estão próximos à linha de tendência. A análise conjunta destas figuras, bem como os valores dos fatores bias e exatidão (Tabela 4.3), demonstra que os modelos secundários propostos podem ser usados para prever os parâmetros de crescimento destas BAL no intervalo de temperatura de 4°C a 30°C.

Tabela 4.3: Valores dos parâmetros de crescimento observados (Obs) e preditos (Pred) pelos modelos secundários de *L. plantarum*, *L. viridescens* e *L. sakei* e os valores dos índices estatísticos (bias e exatidão) calculados para estes modelos.

BAL/ T (°C)	λ (h)		μ (h ⁻¹)		A	
	Obs	Pred	Obs	Pred	Obs	Pred
<i>L. plantarum</i>						
4	40,0	36,5	0,006	0,005	1,8	1,7
8	30,2	21,9	0,026	0,031	2,8	2,8
12	10,8	13,1	0,077	0,081	3,4	3,3
16	6,5	7,9	0,165	0,153	3,4	3,5
20	3,6	4,7	0,265	0,249	3,7	3,7
30	1,8	1,3	0,570	0,588	4,0	3,9
	bias	0,988		0,989		0,993
	exatidão	1,259		1,106		1,021
<i>L. viridescens</i>						
4	61,2	71,4	0,007	0,007	1,6	1,7
8	32,5	25,9	0,027	0,030	2,3	2,4
12	14,5	14,3	0,057	0,069	2,7	2,7
16	10,1	9,4	0,141	0,123	3,0	2,9
20	5,9	6,7	0,218	0,193	3,2	3,0
30	3,6	3,7	0,410	0,437	3,1	3,2
	bias	0,999		1,019		0,999
	exatidão	1,113		1,108		1,028
<i>L. sakei</i>						
4	64,2	78,9	0,003	0,002	1,7	1,6
8	38,2	29,3	0,012	0,010	2,2	2,4
12	19,7	16,4	0,024	0,023	2,9	2,8
16	9,4	10,9	0,038	0,041	3,0	3,0
20	7,9	7,9	0,071	0,065	3,1	3,1
30	4,1	4,4	0,154	0,147	3,3	3,3
	bias	0,999		0,889		1,000
	exatidão	1,159		1,155		1,045

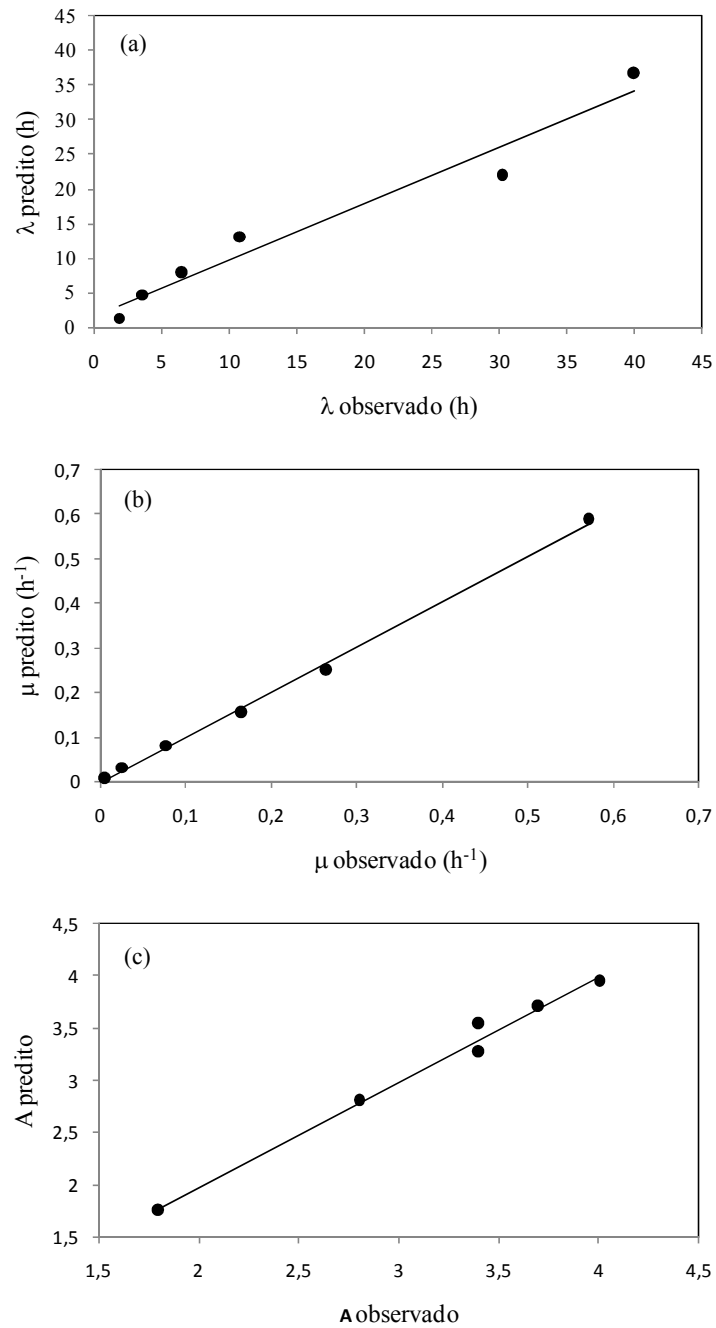


Figura 4.2. Relação entre os parâmetros de crescimento observados vs preditos pelos modelos secundários obtidos para *L. plantarum*. (a): λ (h), (b): μ (h^{-1}) e (c): A .

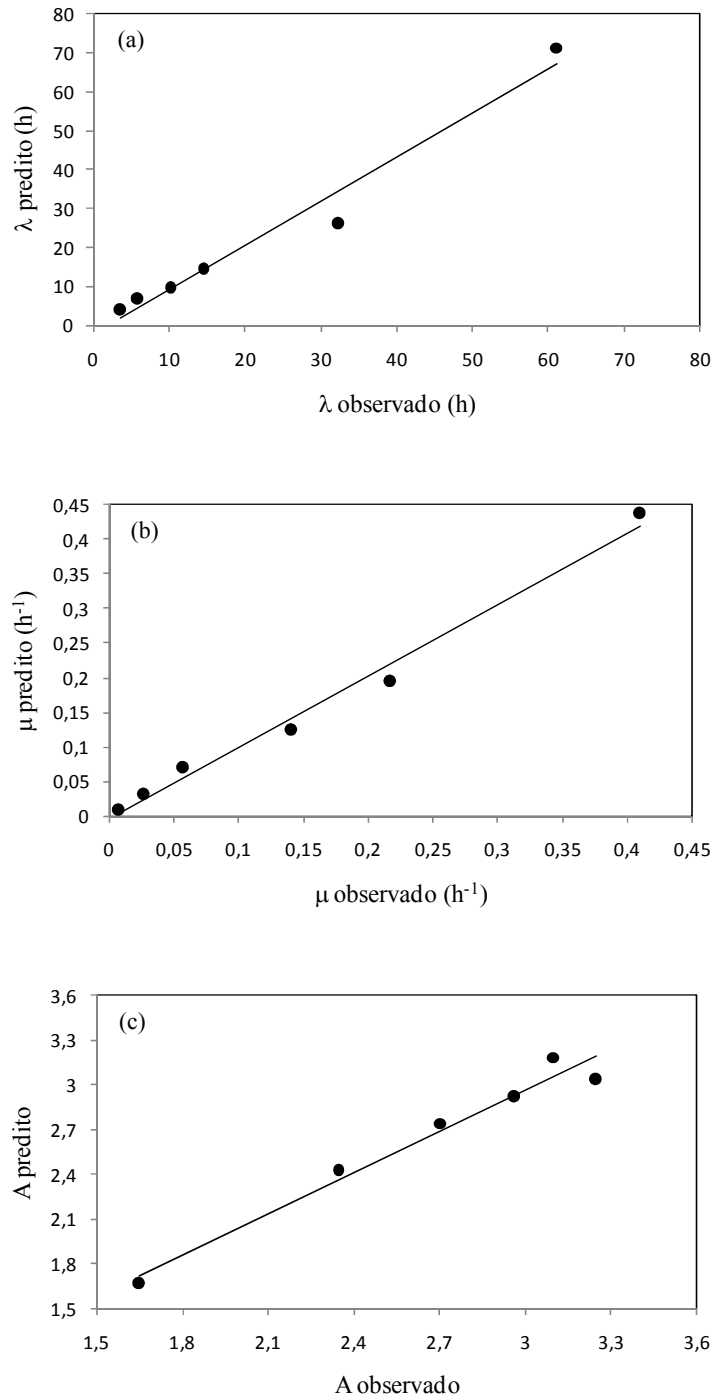


Figura 4.3. Relação entre os parâmetros de crescimento observados vs preditos pelos modelos secundários obtidos para *L. viridescens*. (a): λ (h), (b): μ (h^{-1}) e (c): A.

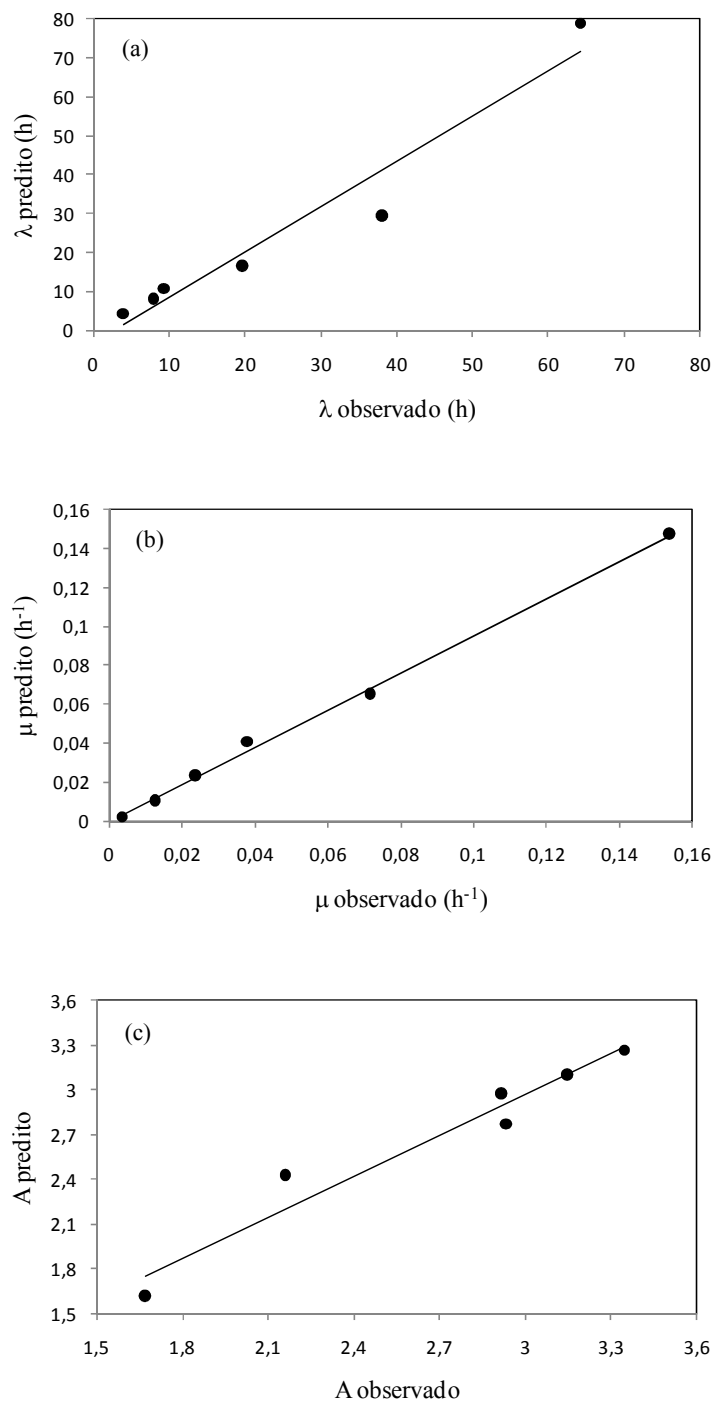


Figura 4.4. Relação entre os parâmetros de crescimento observados vs preditos pelos modelos secundários obtidos para *L. sakei*. (a): λ (h), (b): μ (h^{-1}) e (c): A.

A Figura 4.5 apresenta um exemplo do acompanhamento do pH realizado durante os experimentos com *L. plantarum* em diferentes temperaturas. A comparação do crescimento de *L. plantarum* a 30°C com o decréscimo do pH ao longo do tempo está representado na Figura 4.6. Observa-se pelas figuras que o pH começa a cair consideravelmente quando a bactéria entra em fase exponencial e, no momento em que

ela pára de crescer, entrando na fase estacionária, o pH está próximo de 4, para a maioria das temperaturas. Assim, a curva de pH é um indicativo da fase de crescimento em que a bactéria se encontra.

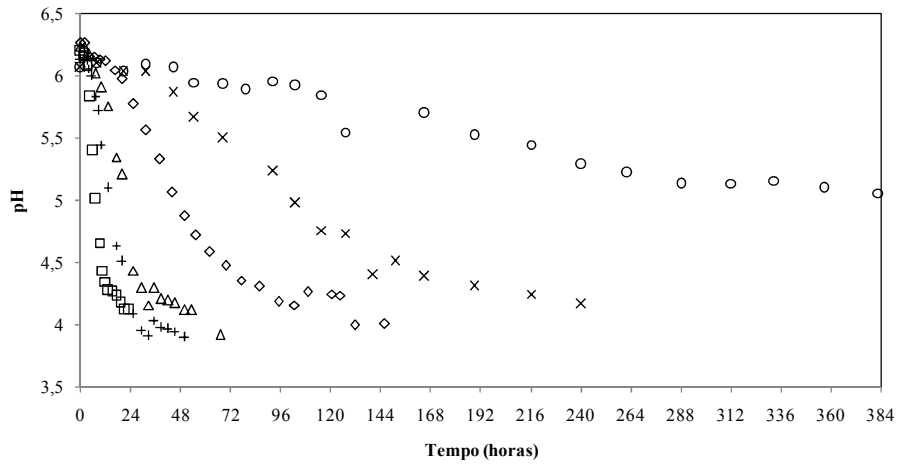


Figura 4.5. Exemplo das análises de pH de *L. plantarum* nas diferentes temperaturas ao longo do tempo (h). 30°C (□), 20°C (+), 16°C (Δ), 12°C (◊), 8°C (×) e 4°C (○).

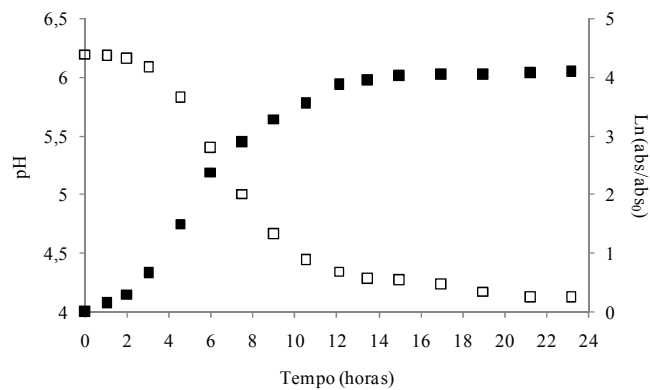


Figura 4.6: Acompanhamento da curva de crescimento (■) e do pH (□) no cultivo de *L. plantarum* a 30°C.

4.1.3 Nomenclatura

BAL ou LAB	Bactérias ácido lácticas
UFC ou CFU	Unidades formadoras de colônias
λ	Duração da fase lag (h)
μ	Velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})
A	Aumento logarítmico da população
T	Temperatura ($^{\circ}C$)
MRS	Meio de cultivo (Man, Rogosa e Sharpe)
Abs	Absorbância no tempo t
abs ₀	Absorbância inicial
$\ln(\text{abs}/\text{abs}_0)$	Logaritmo neperiano da densidade celular no tempo t
T	Tempo (h)
B	Velocidade relativa de crescimento no tempo M (h^{-1})
M	Tempo para atingir a velocidade máxima de crescimento (h)
abs _{max}	Absorbância máxima
K	Parâmetros de crescimento (λ , μ ou A)
T _{min} , a, b, r, n	Coefficientes dos modelos secundários
M	Parâmetro de curvatura do modelo de Baranyi-Roberts
R ²	Coefficiente de correlação
MSE	Erro médio quadrático
RMSE	Raiz do erro médio quadrático
N	Número de dados experimentais
P	Número de parâmetros do modelo
Obs	Valor observado
Pred	Valor predito

4.2 Modelagem matemática do crescimento de *Lactobacillus plantarum* em meio MRS sob condições não isotérmicas.

Com base nas informações obtidas no estudo anterior, os modelos (primário e secundários) que apresentaram melhores ajustes foram selecionados para estabelecer o modelo preditivo não isotérmico, baseado na metodologia proposta por Corradini e Peleg (2005). O modelo proposto neste estudo foi comparado com dados experimentais de *Lactobacillus plantarum* em MRS obtidos de três diferentes perfis de temperatura.

Sarmiento (2006) estudou o crescimento de BAL em mortadela armazenada sob condições não isotérmicas (20-30°C). A população máxima obtida experimentalmente em condições não isotérmicas foi superior à obtida no cultivo isotérmico a 30°C. Uma das hipóteses que explicaria esse comportamento seria o crescimento de algum micro-organismo que se adaptou às condições expostas, ou um fenômeno de homeostase associado à variação da temperatura durante o armazenamento. Por isto, o presente estudo foi realizado com a cepa pura em meio de cultivo, para analisar o comportamento do micro-organismo sob condições não isotérmicas, sem interferência de outros micro-organismos ou compostos presentes nos produtos cárneos.

Após a apresentação do artigo, estão incluídas algumas informações complementares referentes à descrição dos perfis de temperatura e acompanhamento do pH durante os experimentos. Também são apresentadas, para melhor visualização e comparação, as curvas não isotérmicas no mesmo gráfico que as isotérmicas, referentes ao intervalo de temperaturas do perfil estudado.

4.2.1 Artigo 2: Mathematical modeling of *Lactobacillus plantarum* growth under variable temperature conditions

Abstract

A dynamic predictive model was established from isothermal growth data obtained for *Lactobacillus plantarum* in MRS broth and validated from growth data obtained under variable temperature conditions. The modified Gompertz model was used to obtain the primary growth parameters for six constant temperatures (4, 8, 12, 16, 20 and 30°C). The influence of temperature on the lag phase duration (λ), on the maximum specific growth rate (μ) and on the microbial population increase (A) were better described by an exponential equation, by the square root model and by the Arrhenius-type equation,

respectively. To avoid artificial fluctuations on population number during the stationary phase, an effective parameter A , named $A_{\text{effective}}$, was established using the dependency of A on the temperature. Based on Corradini and Peleg model, a differential form of the modified Gompertz model, in combination with the secondary models, was used to establish a non-isothermal growth model. This model was validated with experimental growth curves obtained under three periodic temperature profiles. These profiles were represented by cycles of 12 h, with temperatures varying from 4°C to 12°C, from 5°C to 15°C, or from 20°C to 30°C. The non-isothermal growth predictive model correctly estimated *L. plantarum* growth under different temperature profiles.

Keywords: predictive microbiology, non-isothermal predictive model, *Lactobacillus plantarum*, variable temperature.

1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) has been considered the main spoilage population of vacuum-packaged and modified atmosphere meat products, and other processed products stored under refrigeration temperatures (Borch et al., 1996; Hugas, 1998). The spoilage caused by LAB is primarily due to the production of metabolites, which cause undesirable alterations in appearance, texture and flavor, produce unpleasant odors and flavors, along with the discoloring and slime production on the product's surface (Samelis et al., 2000). In this study, *L. plantarum* was selected because it is a LAB which often causes spoilage in meats and meat products (Hugas, 1998; Drosinos et al., 2006; Farag and Korashy, 2006).

Predictive mathematical models have been used to quantify and predict microbial behavior under different environmental conditions, i.e., to predict bacterial growth as a function of intrinsic and extrinsic factors, such as temperature, pH, water activity, packaging conditions, among others (Zwietering et al., 1990; Devlieghere et al., 2000; Brul et al., 2008). Many mathematical models are based on experimental data of microbial growth at constant conditions. However, conditions such as temperature, pH or composition of the gaseous atmosphere are not always constant during storage. Therefore, in recent years, literature has reported works on dynamic models, i.e., models that allow predicting microorganism growth under conditions that vary over the storage time, mainly non-isothermal conditions (McMeekin et al., 2006; Peleg, 2006; Gospavic

et al., 2008). Temperature is a major factor on food deteriorative reactions, especially on microbial spoilage, since specific growth rate and lag phase are highly temperature dependent (Giannuzzi et al., 1998).

To develop a non-isothermal predictive growth model, two steps are required. Firstly, the growth parameters are obtained from primary models fitted to isothermal experimental data. Afterwards, the influence of temperature on the growth parameters is described by secondary models. To estimate bacterial growth under fluctuating temperature conditions, the differential form of primary growth models must be used (Corradini and Peleg, 2005). Some dynamic predictive models are based on primary models like Gompertz (Van Impe et al., 1995; Huang, 2003; Gospavic et al., 2008), modified Logistic (Corradini and Peleg, 2005; Smith-Simpson et al., 2007), and Baranyi-Roberts models (Baranyi and Roberts 1994; Mataragas et al., 2006; Velugoti et al., 2010). For the establishment of a non-isothermal predictive model, conditions are defined according to each microorganism and foodstuff.

The aim of the present study was to establish a model to predict *Lactobacillus plantarum* growth under non-isothermal conditions and compare this model to experimental data obtained under different temperature profiles. To achieve this aim, the growth of *Lactobacillus plantarum* in MRS broth was fitted with a primary model and secondary models were used to represent the temperature dependence of the growth parameters. It was also assumed that isothermal growth data can be used to predict microbial growth under non-isothermal conditions.

2. Material and methods

2.1. Strain and growth medium

Lactobacillus plantarum ATCC 8014 (André Tosello Foundation, Campinas, Brazil) was grown in MRS (Man, Rogosa and Sharpe) - *Lactobacillus* broth (Acumedia, Inc. Lansing, Michigan, USA). The strain was maintained in MRS broth containing 20% glycerol at -24°C until use.

2.2. Growth conditions

The inoculum was grown for 18 h in MRS broth at 30°C. Experiments were carried out in 160 mL of MRS broth with 1% (v/v) of inoculum in 250 mL Erlenmeyer

flasks. The initial pH was almost 6. The flasks were placed in an incubator with automatic temperature programming (Dist, Florianópolis, Brazil) for maintaining constant temperature or producing the non-isothermal profiles. The growth curves were monitored until the stationary phase.

In a first step, experiments were carried out at different constant temperatures: 4, 8, 12, 16, 20 and 30°C. For each tested temperature, four growth curves were generated: two duplicates at two different days (independent experiments). In a second step, experiments were carried out using three different non-isothermal time-temperature profiles. During the experiments, the temperature was registered every 5 min by mini data loggers (Testo 174, Lenzkirch, Germany).

2.2.1 Sampling

Samples of 2 mL were collected aseptically in a laminar flow device (CFLV-09, Veco, Campinas, Brazil) at predetermined intervals, depending on the growth temperature. The *Lactobacillus plantarum* growth was determined by turbidimetry (*abs*) at 600 nm wavelength with a spectrophotometer (1105, Bel Photonics, Monza, Italy). The growth curves were followed until the stationary phase was achieved, and were obtained by plotting $\ln(abs/abs_0)$ versus t , where *abs* represents the absorbance at time t and abs_0 the initial absorbance.

2.3. Mathematical modeling under variable temperature conditions

The non-isothermal mathematical model used in this study was obtained using the approach reported by Corradini and Peleg (2005). According to these authors, the primary and secondary models, from isothermal growth data, can be used to predict the microbial growth patterns under several non-isothermal conditions. These models were used to generate non-isothermal growth curves by solving, numerically, a differential equation derived on the premise that the momentary non-isothermal growth rate is the isothermal rate at the momentary temperature, at a time that corresponds to the momentary growth level of the population. The primary model that showed the best fit to isothermal growth curves of *L. plantarum* at all tested temperatures was the modified Gompertz model (Zwietering et al., 1991) (Equation 1). This model had the best fit compared to Logistic, modified Logistic and Baranyi-Roberts models (data not shown). So, this model was used to obtain the primary growth parameters, i.e., lag phase

duration (λ), maximum specific growth rate (μ) and microbial population increase (A) at different temperatures.

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

where $\ln(y) = \ln(abs/abs_0)$ is the natural logarithm of the cell density at time t , being abs the absorbance at time t and abs_0 the initial absorbance, $A(T)$ is the microbial population increase, $\mu(T)$ is the maximum specific growth rate (h^{-1}), $\lambda(T)$ is the lag phase duration (h) and $\exp(1) = 2.7182$.

The isothermal momentary growth rate according to this model is represented by Equation 2.

$$\frac{dy(t)}{dt} = \mu(T) \cdot \exp(1) \cdot \exp\left\{\frac{\mu(T) \cdot \exp(1) \cdot (\lambda(T) - t)}{A(T)} + 1\right\} \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu(T) \cdot \exp(1) \cdot (\lambda(T) - t)}{A(T)} + 1\right]\right\} \quad (2)$$

The influence of the environmental factors on the primary growth parameters ($\lambda(T)$, $\mu(T)$ and $A(T)$) can be described by secondary models, using the model showing the best fit to the experimental data. When the temperature varies over time, the secondary models can be expressed as $\lambda[T(t)]$, $\mu[T(t)]$ e $A[T(t)]$.

With the inclusion of secondary models and the equations representing the temperature profiles $T(t)$ in Equation 2, a non-isothermal growth model was obtained (Equation 3).

$$\frac{dy(t)}{dt} = \mu[T(t)] \cdot \exp(1) \cdot \exp\left\{\frac{\mu[T(t)] \cdot \exp(1) \cdot (\lambda[T(t)] - t^*)}{A[T(t)]} + 1\right\} \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu[T(t)] \cdot \exp(1) \cdot (\lambda[T(t)] - t^*)}{A[T(t)]} + 1\right]\right\} \quad (3)$$

where t^* is defined by Equation 4 and represents the time which corresponds to any isothermal growth level, as given by the inverse of Equation 1.

$$t^* = \left(\frac{\mu(T) \cdot \exp(1) \cdot \lambda(T) + A(T) - \ln\left(-\ln\left(\frac{y}{A(T)}\right)\right) A(T)}{\mu(T) \cdot \exp(1)} \right) \quad (4)$$

In this study, the primary and secondary models were fitted by using the Levenberg-Marquardt method and the numerical solution of the non-isothermal model (first order differential equation) was solved with the fourth order Runge-Kutta method using ODE functions (e.g. ODE 15s) on the software Matlab 7 (Math WorksTM, Natick, MA, USA).

From the non-isothermal predictive model (Equation 3), the microorganism growth when the storage temperature varied periodically between 4°C and 30°C was calculated. The temperature profile could be described by a sinusoidal equation, as given by Equation 5.

$$T(t) = a_1 \cdot \sin(b_1 \cdot t + c_1) + a_2 \cdot \sin(b_2 \cdot t + c_2) + \dots + a_8 \cdot \sin(b_8 \cdot t + c_8) \quad (5)$$

where $T(t)$ is the temperature profile (°C) at time t , and a_i , b_i and c_i are the model parameters. Furthermore, in order to represent the experimental temperature profile, rules were imposed to the calculated function, i.e., if $T \leq T_1$, $T=T_1$, and if $T \geq T_2$, $T=T_2$, where T_1 is the lowest temperature (°C) and T_2 is the highest temperature defined by the profile (°C).

2.4 Statistical analysis

The following statistical indices were used to compare fit capacity of the models used to describe the growth curves, and the predictive ability of non-isothermal model: correlation coefficient (R^2), mean square error (MSE), bias factor and accuracy factor (Sutherland et al., 1994; Ross, 1996). The MSE equation is given by Equation 6. The smaller the MSE values, the better the model to fit data.

$$MSE = \frac{\sum (\text{Value}_{\text{observed}} - \text{Value}_{\text{predicted}})^2}{n - p} \quad (6)$$

where n is the number of experimental data and p is the number of model parameters.

The bias factor is an estimate for the average difference between predicted and observed values, and is calculated by Equation 7:

$$\text{bias factor} = 10^{\left(\frac{\sum \log(\text{Value}_{\text{predicted}} / \text{Value}_{\text{observed}})}{n} \right)} \quad (7)$$

The accuracy factor (Equation 8) provides a measure of the absolute average difference between the predicted and observed values.

$$\text{accuracy factor} = 10^{\left(\sum \frac{|\log(\text{Value}_{\text{predicted}} / \text{Value}_{\text{observed}})|}{n} \right)} \quad (8)$$

3. Results and discussion

Figure 1 shows isothermal growth curves of *Lactobacillus plantarum* at six different temperatures, fitted by the modified Gompertz model. Each temperature is exemplified by only one curve, among the four replicates performed for each cultivation condition. It is possible to observe that the model describes well all growth curves. Table 1 shows the average value and the standard deviation of the growth parameters obtained by fitting the modified Gompertz model for each condition.

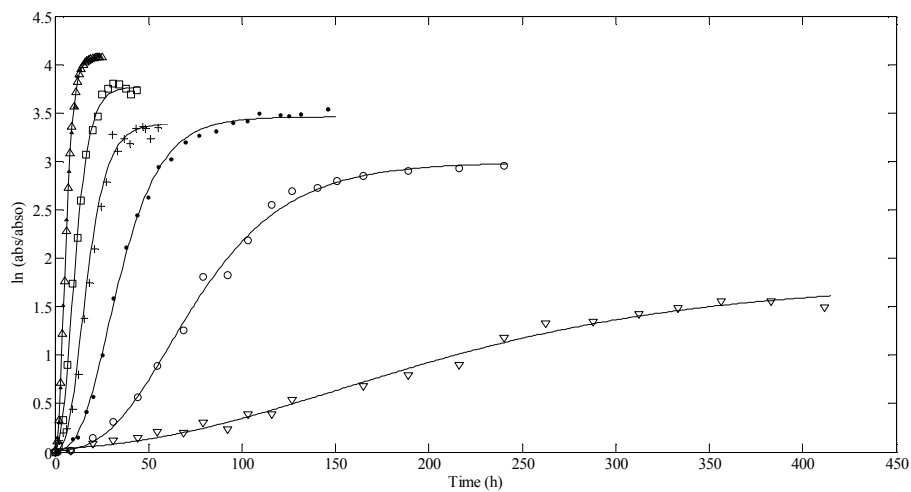


Figure 1. Example of *L. plantarum* isothermal growth curves in MRS broth at different temperatures. The lines represent the modified Gompertz model fitted to experimental data (symbols). (∇) 4°C, (\circ) 8°C, (\bullet) 12°C, ($+$) 16°C, (\square) 20°C and (Δ) 30°C.

Table 1. The mean values and standard deviation for growth parameters of *Lactobacillus plantarum* at different temperatures.

Temperature (°C)	Growth parameters		
	λ (h)	μ (h ⁻¹)	A
4	40.0 ± 5	0.006 ± 0.001	1.8 ± 0.1
8	30.2 ± 4.3	0.026 ± 0.005	2.8 ± 0.3
12	10.8 ± 1.7	0.077 ± 0.007	3.4 ± 0.1
16	6.5 ± 0.1	0.165 ± 0.004	3.4 ± 0.0
20	3.6 ± 0.3	0.265 ± 0.007	3.7 ± 0.2
30	1.8 ± 0.1	0.570 ± 0.02	4.0 ± 0.1

Observing the three growth parameters of the modified Gompertz model (Table 1), it was possible to verify how they vary in the temperature range (4 to 30°C), as well as the small standard deviations observed. Figure 2 shows how *Lactobacillus plantarum* growth parameters vary with temperature, as well as the best fitted curves.

The temperature dependence of the experimental growth parameters of *L. plantarum* shown in Figure 2 are represented by Equations 9, 10 and 11, as well as their respective correlation coefficients (R^2).

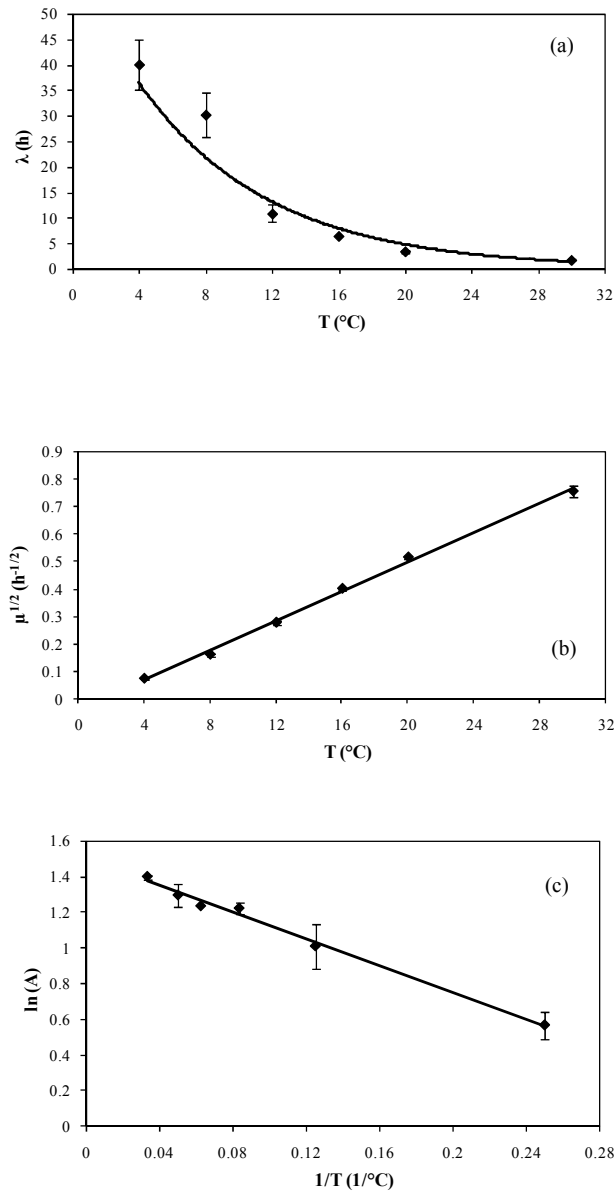


Figure 2. Temperature effect on the *Lactobacillus plantarum* growth parameters: (a) λ - exponential equation; (b) μ - square root model; (c) A - Arrhenius-type equation. The lines (-) represent the secondary model fitted to growth primary parameters (symbols, \blacklozenge). Bars show the standard deviation.

$$\lambda[T(t)] = 60.989 \cdot \exp(-0.128 \cdot T(t)) \quad (R^2 = 0.950) \quad (9)$$

$$\mu^{1/2}[T(t)] = 0.0268 \cdot T(t) - 0.0371 \quad (R^2 = 0.997) \quad (10)$$

$$\ln(A[T(t)]) = -3.755 \left(\frac{1}{T(t)} \right) + 1.4981 \quad (R^2 = 0.992) \quad (11)$$

From the fits of primary and secondary models, it was possible to establish a non-isothermal model to predict the behavior of *Lactobacillus plantarum* within the temperature range studied (4°C to 30°C), under fluctuating temperature conditions. According to Corradini and Peleg (2005), the quality of the estimates of the non-isothermal model depends on the quality of the original isothermal growth data and this depends on the number of temperatures examined and the period between them. These authors state that if the secondary models describe well the dependence of growth parameters in relation to temperature, the non-isothermal model should predict the microbial growth with enough accuracy.

Figure 3a shows the simulation of microbial growth under non-isothermal condition, as given by Equation 3, considering the secondary models shown by Equations 9, 10 and 11. This predicted growth curve has a fluctuation at the beginning of the stationary phase, which is not biologically probable. This fluctuation was caused by the variation in parameter A[T(t)]. In this study, as shown in Figure 2, the parameter A varies depending on the studied temperatures. At 4°C, the parameter A is 1.8 (± 0.1) and 4.0 (± 0.1) at 30°C, unlike many works reporting results on non-isothermal predictive models that consider the parameter A as a constant average value. Sometimes, only the beginning of the stationary phase of simulated non-isothermal growth curves are shown (Huang, 2003; Corradini and Peleg, 2005; Smith-Simpson et al., 2007; Gospavic et al., 2008).

In this study, in order to simulate the stationary phase from the beginning until its end, it was necessary to determine an effective value of A when the culture was submitted to non-isothermal variation. For this, it was considered that the microbial population does not decrease when the temperature profile varies from the highest to the lowest temperature. Instead, the temperature fluctuation leads to an effective A value, that depends on the time that the microorganism stays at each temperature, as represented by Equation 12.

$$A_{\text{effective}} = \frac{\int_{t_0}^{t_n} A[T(t)]dt}{\int_{t_0}^{t_n} dt} \quad (12)$$

where $A[T(t)]$ is defined by Equation 11, $T(t)$ is any temperature profile (e.g., Equation 5), t_0 is the initial time, t_n is the final time.

The values of $A_{\text{effective}}$ were calculated and used along with $\lambda [T(t)]$ (Equation 9) and $\mu [T(t)]$ (Equation 10), for modeling the non-isothermal growth curves. Figure 3b shows the simulation for a non-isothermal condition, with $A_{\text{effective}} = 2.81$. The use of an effective value for A seems to be a rational way of estimating the maximum population under non-isothermal conditions, taking into account how the microorganism remained at each temperature.

Figures 3b and 4a-b show the experimental growth curves of *L. plantarum* under non-isothermal conditions and the predicted growth curves by the non-isothermal model, using $A_{\text{effective}}$ values for three different temperature profiles. At the top, the lines represent non-isothermal predicted curves (Equation 3) and the symbols represent the experimental data under non-isothermal conditions, submitted to the temperature profile represented at the bottom of the figure, where the lines represent the fit of the temperature profile model $T(t)$, and the symbols represent the temperature and time experimental data, obtained by data loggers. The temperature profiles were represented by Equation 5, where each experiment has its own thermal history. The temperature profiles were 5-15°C (Figure 3b), 4-12°C (Figure 4a) and 20-30°C (Figure 4b) with cycles of 12 h at each temperature. The values of $A_{\text{effective}}$, calculated by Equation 12 for the profiles shown in Figures 4a and 4b, were 2.54 and 3.80, respectively.

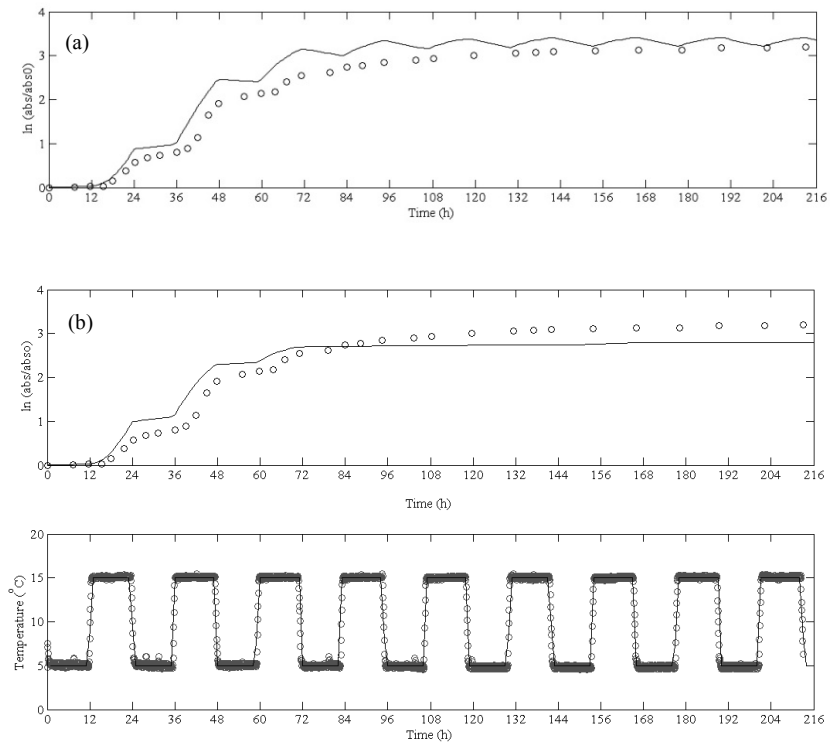


Figure 3. Growth curves of *Lactobacillus plantarum* under non-isothermal conditions. (a) simulation without considering $A_{\text{effective}}$ and (b) simulation with $A_{\text{effective}}$. The lines (—) are the predictions of the models and the symbols (\circ) are experimental data. Top: the experimental and predicted growth curves. Bottom: the temperature profile $T(t)$. *5-15°C profile.

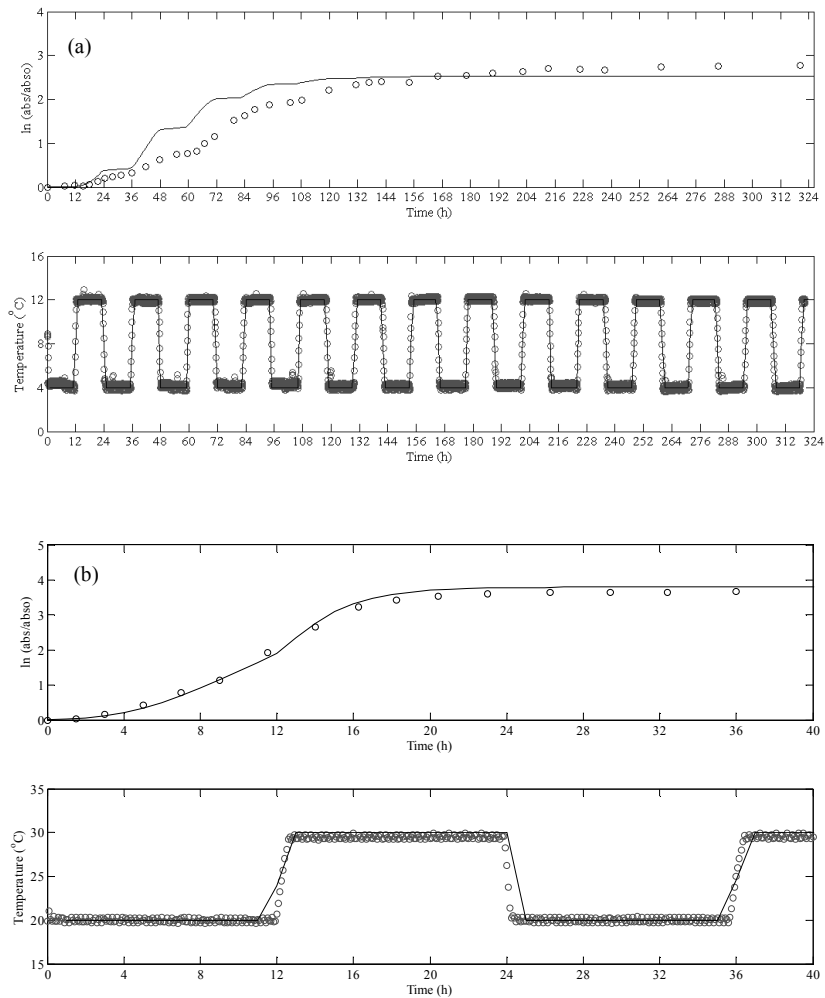


Figure 4. Growth curves of *Lactobacillus plantarum* under non-isothermal conditions. Top: the experimental and predicted growth curves. Bottom: the temperature profile $T(t)$. The lines (—) are the prediction of the models and the symbols (\circ) are experimental data. (a) 4-12°C profile and (b) 20-30°C profile.

The predicted non-isothermal growth curves in Figures 3b and 4a-b predicted well the growth of *L. plantarum*. In Figure 4a, the lag phase is well described and the time predicted to reach the stationary phase is slightly higher than observed experimentally. In approximately 144 h of incubation, corresponding to six cycles of the temperature profile, the microorganism has stopped growing. In Figure 3b, the temperature varied from 5°C to 15°C, successively. Despite the relatively small differences between the temperature profiles (comparing figures 3b and 4a), the differences between the two predicted growth curves are important. In 72 h (approximately three whole cycles of the temperature profile) the microorganism

reaches the stationary phase, indicating that after this period there is no more effect of the lowest temperature half-cycle. The beginning of the stationary phase and specific growth rate were predicted with enough accuracy by the model, but the experimental growth data were slightly higher than what was predicted for the stationary phase.

Figure 4b shows that the model perfectly predicts the experimental growth curve. The similar shapes of both growth curves, at 20°C and at 30°C, led to similar values of parameter A (3.7 and 4.0), and can be used to explain this model's excellent predictive ability. As observed in the literature, in general, the smaller the difference in growth parameters, mainly for parameter A, at different isothermal temperatures, the greater the accuracy observed for the non-isothermal model.

Table 2 shows the comparison between the values predicted by the non-isothermal model and the data observed experimentally, using the statistical indices R^2 , MSE, bias and accuracy factor. The analysis is performed for three different temperature profiles shown in Figures 3b and 4a-b. A good agreement is observed between the non-isothermal model predictions and the experimental data, despite the lower predictive ability of the model for the experimental growth curve obtained for the temperature profile 4-12°C. In this study, as seen in Figure 3b and 4a-b, and in Table 2, the non-isothermal model predicted satisfactorily *L. plantarum* growth under different temperatures profiles.

Table 2. Statistical indices *L. plantarum* at different temperatures profiles.

Temperature Profiles	Statistical Indices			
	R^2	MSE	Bias	Accuracy
4-12°C	0.859	0.163	1.244	1.435
5-15°C	0.934	0.098	1.139	1.270
20-30°C	0.993	0.018	0.977	1.094

In this study, the growth curves of *Lactobacillus plantarum* were assessed in MRS broth. Literature reports that in some cases the results obtained in culture broth can be effectively used to understand the microorganism behavior in food products (Devlieghere et al., 1998; Drosinos et al., 2006). According to Sarmiento (2006) the results obtained for pure cultures (*L. plantarum* and *L. sakei*) in MRS broth were useful to obtain new formulations for meat products in which different LAB are present. The non-isothermal model proposed in this study could be helpful for investigating the influence of temperature profiles on the growth of the microorganisms controlling the

shelf-lives of meat and meat products under the same non-isothermal conditions.

4. Conclusions

The growth data of *Lactobacillus plantarum* in MRS broth at different isothermal temperatures (4, 8, 12, 16, 20 and 30°C) were fitted well by the modified Gompertz model to obtain the primary growth parameters, and the influence of temperature on parameters λ , μ and A were represented by the exponential equation, square root model and Arrhenius-type equation, respectively. From the secondary and primary models, a non-isothermal mathematical model was established and validated to predict the growth of *Lactobacillus plantarum* under variable temperature conditions. The calculation of an effective parameter A, called $A_{\text{effective}}$, was useful to simulate the stationary phase of the growth curve. The present study showed that the Gompertz model can be used as the primary model for the establishment of non-isothermal model using the methodology proposed by the literature. The non-isothermal model could correctly predict *Lactobacillus plantarum* growth under different temperature profiles (4-12°C, 5-15°C and 20-30°C).

Acknowledgments

Financial support provided by CAPES-Brazil is gratefully acknowledged.

References

- Baranyi, J., Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.
- Borch, E., Kant-Muemansb, M.L., Blixt, Y. 1996. Bacterial spoilage of meat products and cured meat. *International Journal of Food Microbiology* 33, 103-120.
- Brul, S., Mensonides, F.I.C., Hellingwerf, K.J., Mattos, M.J.T. 2008. Microbial systems biology: new frontiers open to predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology* 128, 16-21.
- Corradini, M. G., Peleg, M. 2005. Estimating non-isothermal bacterial growth in foods from isothermal experiments data. *Journal of Applied Microbiology* 99, 187-200.

- Corradini, M.G., Amézquita, A., Normand, M.D., Peleg, M. 2006. Modeling and predicting non-isothermal microbial growth using general purpose software. *International Journal of Food Microbiology* 106, 223-228.
- Devlieghere, F., Geeraerd, A.H., Versyck, K.J., Bernaert, H., Van Impe, J.F., Debevere, J. 2000. Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of Na-lactate as a fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. *International Journal of Food Microbiology* 58, 93–106.
- Devlieghere, F., Debevere, J., Van Impe, J.F. 1998. Effect of dissolved carbon dioxide and temperature on the growth of *Lactobacillus sake* in modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology* 41, 231–238.
- Drosinos, E.H., Mataragas, M., Kampani, A., Kritikos, D., Metaxopoulos, I. 2006. Inhibitory Effect of Organic Acid Salts on Spoilage Flora in Culture Medium and Cured Cooked Meat Products Under Commercial Manufacturing Conditions. *Meat Science* 73, 75-81.
- Farag, H.E.M., Korashy N.T. 2006. Lactic acid and pH as indication for bacterial spoilage of meat and some meat products. *Journal of Applied Sciences Research* 2(8), 522-528.
- Giannuzzi, L., Pinotti, A., Zaritzky, N. 1998. Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated beef at different temperature. *International Journal of Food Microbiology* 39, 101-110.
- Gospavic, R., Kreyenshimidt, J., Bruckner, S., Popov, V., Haque, N. 2008. Mathematical modeling for predicting the growth of *Pseudomonas* spp. in poultry under variable temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology* 127, 290-297.
- Huang, L. 2003. Estimation of growth of *Clostridium perfringens* in cooked beef under fluctuating temperature conditions. *Food Microbiology* 20, 549-559.
- Hugas, M. 1998. Bacteriocinogenic lactic bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science* 49, 139-150.
- Mataragas, M., Drosinos, E.H., Vaidanis, A., Metaxopoulos, I. 2006. Development of a Predictive Model for Spoilage of Cooked Cured Meat Products and Its Validation Under Constant and Dynamic Temperature Storage Conditions. *Journal of Food Science* 71, 157-167.

- McMeekin, T.A., Baranyi, J., Bowman, J., Dalgaard, P., Kirk, M., Ross, T.; Schmid, S., Zwietering, M.H. 2006. Information systems in food safety management. *International Journal of Food Microbiology* 112, 181–194.
- Peleg, M. 2006. *Advanced Quantitative Microbiology for Foods and Biosystems: models for Predicting Growth and Inactivation*. CRS Series in Contemporary Food Science. Taylor & Francis Group. New York, USA.
- Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology* 81, 501-508.
- Samelis, J., Kakouri, A., Rementzis, J. 2000. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *Food Microbiology* 17, 329-340.
- Sarmiento, C.M.P. 2006. *Modelagem do Crescimento Microbiano e Avaliação Sensorial no estudo da Vida de Prateleira de mortadela e lingüiça defumada em armazenamento isotérmico e não isotérmico*. PhD Thesis. Chemical Engineering Graduate Program, UFSC, Florianópolis, Brazil.
- Smith-Simpson, S., Corradini, M.G., Normand, M.D., Peleg, M., Schaffner, D.W. 2007. Estimating microbial growth parameters from non-isothermal data: A case study with *Clostridium perfringens*. *International Journal of Food Microbiology* 118, 294-303.
- Sutherland, J.P., Bayliss, A.J., Roberts, T.A. 1994. Predictive modeling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology* 21(3), 217-236.
- Van Impe, J.F., Bart, M.N., Schellekens, M.; Martens, T., Baerdemaeker, J.A. 1995. Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. *International Journal of Food Microbiology* 25, 227-249.
- Velugoti, P.R., Bohra, L.K., Juneja, V.K., Huang, L., Wesseling, A.L., Subbiah, J., Thippareddi, H. 2010. Dynamic model for predicting growth of *Salmonella* spp. in ground sterile pork. *Food Microbiology in press*, 1-8.
- Zwietering, M.H., Koos, J.T., Hasenack, B.E., Wit, J.C., Riet, K.V. 1991. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1094-1101.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Riet, K.V. 1990. Modeling of bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1875-1881.

4.2.2 Informações complementares

Para melhor visualização e compreensão dos perfis de temperatura propostos, as curvas de crescimento isotérmicas referentes ao intervalo de temperatura dos perfis estudados são apresentadas no mesmo gráfico que as curvas não isotérmicas (Figura 4.7). Nota-se que as curvas de crescimento não isotérmicas estão localizadas entre as curvas isotérmicas para cada perfil, sendo que em nenhum dos casos foi observado o possível fenômeno da homeostase, como descrito por Sarmento (2006). Estes resultados estão de acordo com a literatura, onde as simulações de crescimento sob variação de temperatura estão dentro dos limites isotérmicos utilizados para o estabelecimento do modelo não isotérmico.

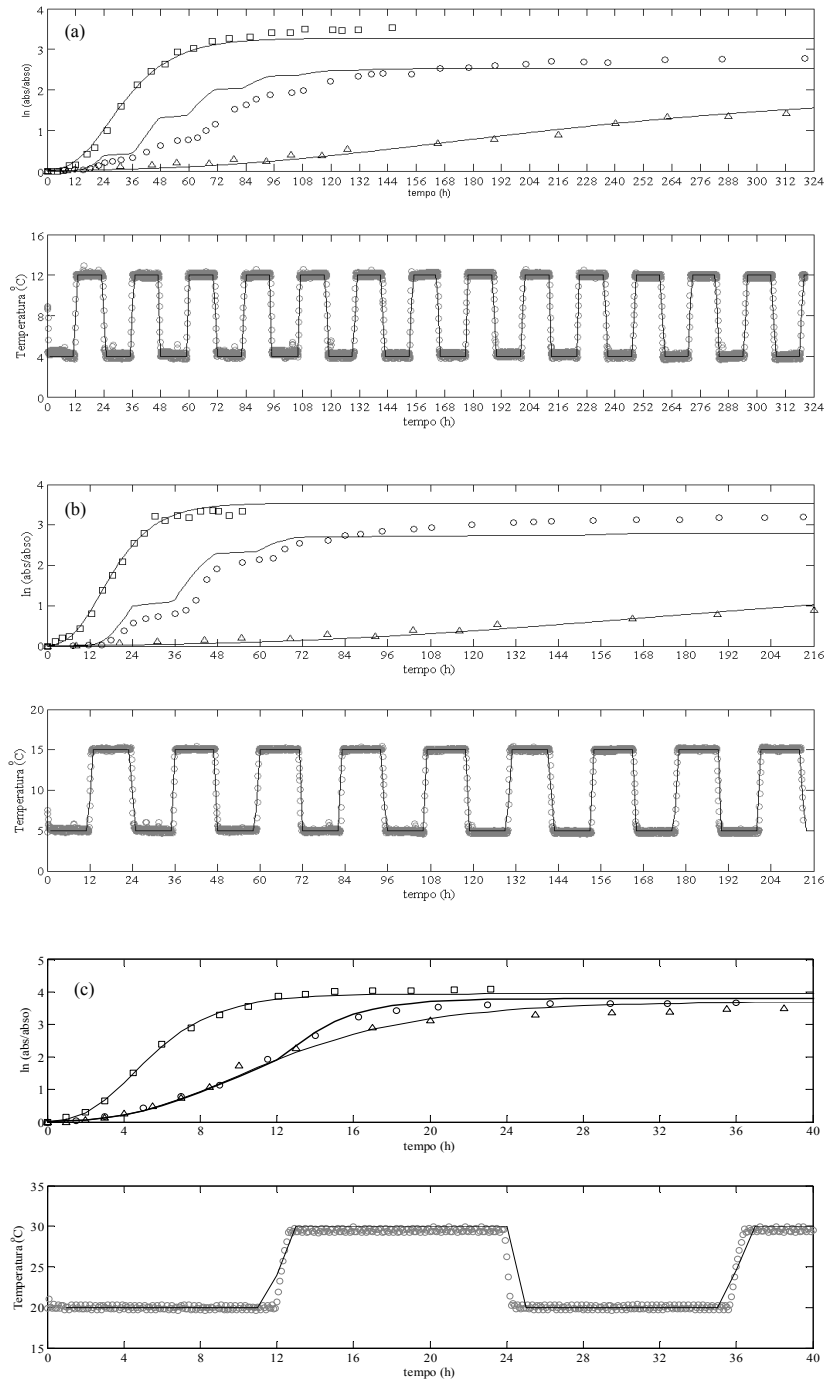


Figura 4.7. Curvas de crescimento de *Lactobacillus plantarum* sob condições isotérmicas e não isotérmicas. *Top*: curvas de crescimento experimentais e preditas. *Bottom*: perfil de temperatura $T(t)$. As linhas (—) representam os ajustes dos modelos e os símbolos representam os dados experimentais. (a) 4°C (Δ), 12°C (\square) e 4-12°C (\circ); (b) 4°C (Δ), 16°C (\square) e 5-15°C (\circ); (c) 20°C (Δ), 30°C (\square) e 20-30°C (\circ).

Os valores dos parâmetros e índices obtidos pela Equação 5 para descrever os diferentes perfis de temperatura estão apresentados na Tabela 4.4. A descrição dos perfis é específica para cada conjunto de tempo-temperatura obtido durante os experimentos não isotérmicos pelo *data logger*.

Tabela 4.4. Valores dos parâmetros e índices (Equação 5) definidos para os diferentes perfis de temperatura 4-12°C, 5-15°C e 20-30°C.

Perfil/ Parâmetro	Índices							
	1	2	3	4	5	6	7	8
4-12°C								
a	54,800	46,680	0,300	4,964	1,633	-0,037	0,241	0,969
b	0,005	0,006	0,286	0,266	0,799	0,219	0,288	1,331
c	0,715	3,784	-0,901	-3,220	2,904	1,392	1,999	2,756
5-15°C								
a	20,470	6,404	14,360	2,110	3,908	1,239	0,841	0,626
b	0,013	0,266	0,023	0,799	0,031	1,331	1,863	2,395
c	0,024	3,048	2,091	2,880	4,245	2,741	2,582	2,468
20-30°C								
a	44,390	23,670	29,100	1,963	35,950	1,114	0,738	12,260
b	0,076	0,139	0,312	0,787	0,342	1,308	1,826	0,374
c	-0,346	1,191	0,751	-3,304	3,033	-3,183	-3,024	5,343

A Figura 4.8 apresenta um exemplo do acompanhamento do pH durante os experimentos não isotérmicos. Através da observação desta figura, é possível perceber as trocas dos ciclos de temperatura, onde a diminuição do pH tende a ser atenuada no momento em que o ciclo passa da maior para a menor temperatura, até o ponto em que o valor do pH estabiliza, momento este em que a BAL se encontra na fase estacionária.

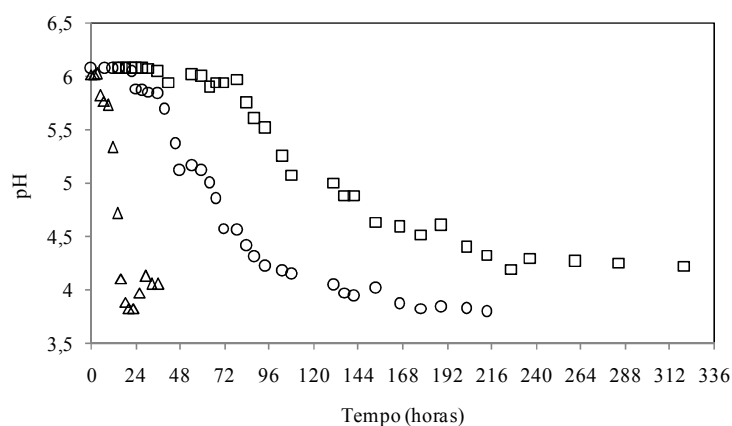


Figura 4.8. Exemplo do acompanhamento do pH durante o cultivo de *L. plantarum* sob condições não isotérmicas. Perfis: 4-12°C (□), 5-15°C (○) e 20-30°C (Δ).

4.2.3 Nomenclatura

BAL ou LAB	Bactérias ácido lácticas
MRS	Meio de cultivo (Man, Rogosa e Sharpe)
T	Temperatura (°C)
λ	Duração da fase lag (h)
μ	Velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})
A	Aumento logarítmico da população
$\lambda(T)$	Parâmetro obtido à temperatura constante
$\mu(T)$	Parâmetro obtido à temperatura constante
$A(T)$	Parâmetro obtido à temperatura constante
T(t)	Perfil de temperatura
$\lambda[T(t)]$	Parâmetro obtido com variação de temperatura
$\mu[T(t)]$	Parâmetro obtido com variação de temperatura
$A[T(t)]$	Parâmetro obtido com variação de temperatura
abs	Absorbância no tempo t
abs ₀	Absorbância inicial
t	Tempo (h)
$\ln(\text{abs}/\text{abs}_0)$	Logaritmo neperiano da densidade celular no tempo t
$\ln y$	$\ln(\text{abs}/\text{abs}_0)$
a_i, b_i, c_i	Parâmetros da equação senoidal
R^2	Coefficiente de correlação
MSE	Erro médio quadrático
n	Número de dados experimentais
p	Número de parâmetros do modelo
ODE	Equação diferencial ordinária
exp(1)	2,7182

4.3 Modelagem dos efeitos combinados da temperatura, pH, cloreto de sódio e lactato de sódio na velocidade de crescimento de *Lactobacillus plantarum*.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um modelo de superfície de resposta para descrever os efeitos combinados de diferentes temperaturas de incubação, níveis de pH, concentrações de NaCl e concentrações de Na-lactato na velocidade de crescimento de *Lactobacillus plantarum* em meio de cultivo MRS, mediante leituras de absorvância em Bioscreen C.

Ao final do capítulo, após a apresentação do artigo, estão incluídas algumas informações complementares referentes a um exemplo de curva de crescimento obtida no Bioscreen C, a relação entre a concentração celular e os dados de absorvância, além da representação gráfica da velocidade de crescimento observada e predita pelo modelo da superfície de resposta.

4.3.1 Artigo 3: Modeling the combined effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium lactate concentrations on *Lactobacillus plantarum* growth rate

Abstract

A response surface model of *Lactobacillus plantarum* growth rate was built in this study under different temperatures (4, 7, 10, 13 and 16°C), pH (5.5, 6.0, 6.5, 7.0 and 7.5), sodium chloride (0, 1.5, 3.0, 4.5 and 6.0%) and sodium lactate (0, 1, 2, 3 and 4%) concentrations through a central composite rotatable design. All the factors were statistically significant at a confidence level of 90% ($p < 0.10$). When temperature and pH increased, there was a corresponding increase in the growth rate, whereas when the concentration of NaCl and Na-lactate increased in the MRS broth, this growth parameter decreased. A mathematical validation was performed with additional conditions within the model range, resulting in acceptable values of root mean square error (0.008), bias factor (1.0863) and accuracy factor (1.1808). The developed model could be useful for predicting *L. plantarum* behavior in foods with a similar composition to the media used in this work.

Keywords: Predictive microbiology, *Lactobacillus plantarum*, response surface model, growth rate, environmental factors.

1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are used in food fermentation processes (e.g., production of yoghurt, cheese and fermented foods such as vegetables, seafood or meat products) (Rao et al., 2004; Massaguer, 2005). However, the uncontrolled growth of some species of lactic acid bacteria, such as *Lactobacillus plantarum*, can cause deterioration in meat and meat products (Hugas, 1998; Drosinos et al., 2006). Controlling the progress of spoilage in processed meats is difficult, as these bacteria are psychotropic, microaerophilic, resistant to nitrite, salt and smoke (Franz and Von Holy, 1996). LAB are the main microorganism group responsible for the spoilage of refrigerated modified atmosphere or vacuum-packaged meat products, such as ham, sausage, chicken breast, among others (Borch et al., 1996; Hugas, 1998; Slongo et al., 2009). As a result of LAB activities, sour off-flavors and off-odors, milky exudates, viscous slime formation, swelling of the pack, and/or greenish color can be observed (Samelis et al., 2000; Cayré et al., 2003).

Temperature seems to be the most important factor influencing the spoilage and safety of meat products (Nychas et al., 2008). In addition to the temperature control throughout the cold chain, many strategies are used in food preservation to increase shelf life, such as the use of chemical agents, whose amounts added to foods are regulated by specific legislations. The efficiency of any chemical preservatives in food depends on their concentrations, product pH, storage temperature, among others (Franco and Landgraf, 1996). Sodium chloride (NaCl) is the most important substance added to foods, which exerts a bacteriostatic effect through the reduction of water activity, and also enhances food flavor (Neumeyer et al., 1997). Other salts, such as sodium lactate (Na-lactate), have been used to control microbial growth, extending the shelf lives of meat products (Sutton et al., 1997; Devlieghere et al., 2000) and improving their sensory attributes (Sallam, 2007; Zhou et al., 2010). Lactate can also minimize lipid oxidation, which may influence color stability, because lipid oxidation and myoglobin oxidation are interrelated processes known to abbreviate the color life of beef (Mancini et al., 2010).

The interest on predictive microbiology is increasing because it is a useful tool (reliable and economic) to evaluate the safety and shelf lives of food products based on models describing the growth of pathogenic and spoilage microorganisms (McDonald and Sun, 1999; Pexara et al., 2002; Mataragas et al., 2006; Antwi et al., 2008). In

predictive microbiology, microorganism growth is quantitatively described as a function of many environmental parameters, both intrinsic and extrinsic (Messens et al., 2003; Brul et al., 2008).

The development of predictive models requires a large amount of microbial growth data, which is difficult to achieve through traditional microbial culture techniques (Augustin et al., 1999). One alternative widely reported by the literature is based on absorbance measurements, resulting in a large amount of data. This technique can be automatic, non-destructive, quick, inexpensive, accurate and effort balanced (Dalgaard and Koutsoumanis, 2001; García-Gimeno et al., 2002; Rodríguez-Pérez, 2004). Researches on food microbiology have been directed towards developing models describing the combined effects of environmental factors on microbial growth (Devlieghere et al., 1999, 2000; Zurera-Cosano et al., 2005; Valero et al., 2007).

Statistical experimental designs such as full factorial design, fractional factorial design or central composite rotatable design can be used in microbial processes to determine the main effects and interactions of the factors that play important roles in microbial response (Haaland, 1989). Response surface methodology is the most often used technique to describe the relation between the combined factors and the growth parameters, as well as on the identification of the optimum conditions for a multi-variable system (Liu et al., 2004; Zurera-Cosano et al., 2006; Nasrabadi and Razavi, 2010).

The aim of the present study was to develop a response surface model to describe the combined effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium lactate concentrations on *Lactobacillus plantarum* growth rate.

2. Material and methods

2.1. Inoculum

For the preparation of the inoculum of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (Spanish Collection of Strain Types, Valencia, Spain), a freeze-dried strain was recovered and maintained at -18°C in cryovials containing beads and cryopreservative (MicrobankTM, Richmond Hill, Canada) until utilization. The inoculum was carried out in tubes with 10 mL of MRS broth (Man, Rogosa and Sharpe) (Oxoid Ltd., Hampshire, England), which were incubated at 30°C for 24 h in an incubator with 10% CO₂ atmosphere (Crenesys Instrumentation, Madrid, Spain). Afterwards, 0.1 mL of the

culture was transferred to 10 mL of MRS broth and incubated for 18 h under the same conditions presented above. Subsequently, the necessary dilutions were made in the MRS broth to obtain an inoculum size of almost 10^3 CFU/mL in the test media. To accurately determine the number of cells injected into the samples, a calibration curve was determined at 30°C. For this purpose, decimal dilutions were made in a 0.85% saline solution (Panreac, Barcelona, Spain) and plated, in duplicate, on MRS Agar (Oxoid Ltd.) and incubated at 30°C for 48 h in a 10% CO₂ atmosphere.

2.2. Experimental design and data collection

The behavior of *L. plantarum* was evaluated under a set of temperature (4, 7, 10, 13 and 16°C), pH (5.5, 6, 6.5, 7 and 7.5), sodium chloride (NaCl) (0, 1.5, 3, 4.5 and 6%) and sodium lactate (Na-lactate) (0, 1, 2, 3 and 4%) conditions, comprising the domain of the central composite rotatable design (CCRD), which resulted in 26 combinations that can be observed in Table 2. Also, 54 extra combinations were carried out (Table 5) to allow for further model validation. Sodium chloride (Panreac) and sodium DL-lactate solution at 60% (w/w) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) concentrations were obtained by adding the appropriate amount of these reagents to a series of flasks containing 50 mL MRS. The flasks were autoclaved (121°C for 15min), and the pH was adjusted with sterile NaOH (5M) (Panreac) and HCl (5M) (Panreac) solutions to obtain different combinations of pH. These test media were inoculated with *L. plantarum* to obtain a concentration of almost 10^3 CFU/mL.

To obtain *L. plantarum* growth data, a Bioscreen C analyzer instrument (Labsystem, Helsinki, Finland) was employed. The equipment was set to collect absorbance (abs) measurements at 600 nm at adequate time intervals. Bioscreen C plates' wells were filled up with 250 µL of the inoculated test media, and the analyses were performed until the stationary phase of *L. plantarum* was reached. Four wells per condition were filled up with inoculated media and two wells per condition were filled up with sterile media to serve as control.

2.3. Growth rates estimation

2.3.1 Growth curve fitting

Lactobacillus plantarum growth data obtained through Bioscreen C (abs data)

were loaded onto a Microsoft Excel spreadsheet and analyzed to calculate the growth rate for each test condition. Thus, a three-phase linear model (Buchanan et al., 1997) was applied to describe the growth of the microorganisms, expressed as Log_{10} CFU/mL vs time, being the exponential phase modeled by the Equation 1.

$$\text{Log}_{10}N = \text{Log}_{10}N_0 + \mu \cdot t \quad (1)$$

where $\text{Log}_{10} N$ is the decimal logarithm of the cell concentration at time t (CFU/mL), N_0 is the initial cell concentration (CFU/mL), μ is the maximum specific growth rate (h^{-1}), which will be called only growth rate in this study, and t is time (h).

Bioscreen C is limited to indirectly measure cell concentrations in the range of about 10^7 to 10^9 CFU/mL. In this study, as the Bioscreen C plates were inoculated with almost 10^3 CFU/mL per well, only a part of the exponential phase was detected, because the adaptation phase (lag phase) recorded by the equipment actually corresponds to the lag phase added to part of the exponential phase (including counts from 10^3 up to 10^7 CFU/mL). Therefore, Equation 1 cannot be applied directly and some considerations were established. First of all, a correlation between absorbance and concentration (CFU/mL) of *L. plantarum* was determined, by means of a calibration curve (Equation 2).

$$\text{Log}_{10}N = a \cdot \text{Log}_{10}abs + b \quad (2)$$

where $\text{Log}_{10} N$ is the decimal logarithm of the cell concentration at time t , abs is the absorbance, and a and b are equation parameters.

In Equation 1, $\text{Log}_{10} N$ was replaced by the expression of Equation 2, and the parameter a was isolated, as given by Equation 3, which can be applied for any pair of points in the exponential phase.

$$a = \frac{\text{Log}_{10}N_0 + \mu \cdot t_p - b}{\text{Log}_{10}abs_p} = \frac{\text{Log}_{10}N_0 + \mu \cdot t_q - b}{\text{Log}_{10}abs_q} \quad (3)$$

where Log_{10} , N_0 , μ , and t have the same meaning as in Equation 1, abs , a and b have the same meaning as in Equation 2, and the subscript letters p and q correspond to any

points of the exponential phase of the absorbance vs. time curve.

From Equation 3, the parameter μ was isolated, as can be seen in Equation 4. This equation involves abs data, related time (h), and initial concentration of *L. plantarum*.

$$\mu = \frac{(\text{Log}_{10}\text{abs}_p - \text{Log}_{10}\text{abs}_q) \cdot (\text{Log}_{10}N_0 - b)}{\text{Log}_{10}\text{abs}_q \cdot t_p - \text{Log}_{10}\text{abs}_p \cdot t_q} \quad (4)$$

where Log_{10} , N_0 , μ , and t have the same meaning as in Equation 1, abs and b have the same meaning as in Equation 2, and the subscript letters p and q have the same meaning as in Equation 3.

In Equation 4 it is assumed that no lag phase occurs. Nevertheless, this is not true, especially at limiting conditions. For this reason, Equation 4 was modified to include lag phase, as observed in Equation 5.

$$\mu = \frac{(\text{Log}_{10}\text{abs}_p - \text{Log}_{10}\text{abs}_q) \cdot (\text{Log}_{10}N_0 - b)}{\text{Log}_{10}\text{abs}_q \cdot (t_p - \lambda) - \text{Log}_{10}\text{abs}_p \cdot (t_q - \lambda)} \quad (5)$$

where Log_{10} , N_0 , μ , and t have the same meaning as in Equation 1, abs and b have the same meaning as in Equation 2, the subscript letters p and q have the same meaning as in Equation 3 and λ is the lag phase (h).

The lag phase was calculated on the basis of the relation between μ and λ given in Equation 6, supported by many authors (Cooper, 1963; Chandler and McMeekin, 1985; Baranyi and Roberts, 1994; Rosso, 1995; Gospavic et al., 2008).

$$\mu \cdot \lambda = K \quad (6)$$

where K is a constant which is microorganism specific at the same pre-culture conditions.

The constant K was obtained by applying Equation 6 to a previous experiment with *L. plantarum* cultivated in MRS broth at different temperatures from the inoculum at 10^7 CFU/mL (data shown in section 4.1.1), and the kinetic parameters μ and λ were obtained. Combining Equations 5 and 6, the expression to calculate λ is given by Equation 7.

$$\lambda = \frac{K.(q.t_p - p.t_q)}{p.(Log_{10}N_0 - b - K) - q.(Log_{10}N_0 - b - K)} \quad (7)$$

where Log_{10} , N_0 , and t have the same meaning as in Equation 1, b has the same meaning as in Equation 2, p and q are $Log_{10}abs_p$ and $Log_{10}abs_q$ respectively, which have the same meaning as in Equation 3 and K has the same meaning as in Equation 6.

All the considerations described in Equations 2 to 7 supported the use of the abs data to describe *L. plantarum* growth.

2.3.2 Response surface model development

The response surface model (RSM) was used to describe the statistical significance of different variables (temperature, pH, NaCl and Na-lactate) on the *L. plantarum* growth rate through a central composite rotatable design (CCRD). RSM is an empirical statistical technique employed for multiple regression analysis using quantitative data obtained from properly designed experiments to solve multi-variable equations simultaneously. In a system involving four significant independent variables, the mathematical relationship of the response of these variables can be approximated by a second degree polynomial equation (Equation 8) (Barros et al., 1995; Rodrigues and Iemma, 2005).

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{44}X_4^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{34}X_3X_4 \quad (8)$$

where Y is the predicted value, b_0 is the average coefficients, X_1 , X_2 , X_3 and X_4 are the independent variables, b_1 , b_2 , b_3 and b_4 are the linear coefficients, b_{11} , b_{22} , b_{33} and b_{44} are the quadratic coefficients and b_{12} , b_{13} , b_{14} , b_{23} , b_{24} and b_{34} are the cross product coefficients.

2.4 Model validation

After the establishment of RSM, 54 additional conditions for model validation were selected randomly within the domain of the model, which were homogeneously

distributed among the five investigated temperatures (Table 5), in order to evaluate the predictive capacity of the proposed model.

2.5 Evaluation criteria

The experimental data obtained by CCRD and additional conditions were treated with the software STATISTICA 6.0 (StatSoft™, Tulsa, OK, USA). This software also generated response surface plots. The quality of fit of the RSM was expressed by the determination coefficient (R^2), and its statistical significance ($p < 0.10$) was determined by analysis of variance - ANOVA (F test).

To evaluate the predictive accuracy of RSM, the following evaluation criteria were employed: root mean squares error (RMSE) (Equation 9), bias factor (B_f) (Equation 10), and accuracy factor (A_f) (Equation 11) (Ross, 1996).

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum (\mu_{obs} - \mu_{pred})^2}{n - p}} \quad (9)$$

$$B_f = 10^{\left(\frac{\sum \log\left(\frac{\mu_{pred}}{\mu_{obs}}\right)}{n} \right)} \quad (10)$$

$$A_f = 10^{\left(\frac{\sum \left| \log\left(\frac{\mu_{pred}}{\mu_{obs}}\right) \right|}{n} \right)} \quad (11)$$

where μ is the growth rate, *obs* is the observed value, *pred* is the predicted value, n is the number of experimental data and p is the number of model parameters.

3. Results and discussion

Effect of environmental variables on the growth rate of L. plantarum

The relationship between cell concentration (Log_{10}N (CFU/mL)) and absorbance data ($\text{Log}_{10}\text{abs}$) of *Lactobacillus plantarum* is given by Equation 12. Absorbance represents only that of bacterial suspension, as absorbance of blanks were subtracted.

$$\text{Log}_{10} N = 1.2246 (\text{Log}_{10} \text{ abs}) + 9.3152 \quad R^2 = 0.9683 \quad (12)$$

The parameter b (i.e., 9.3152) obtained in this equation was used for calculating the lag phase and growth rate, according to Equations 7 and 5, respectively. The lag phase was calculated considering the K value estimated by Equation 6, applied to previous data of the kinetic parameters of *L. plantarum* (Table 1). The average K estimated was 0.41. In Equation 7, *q* and *p* values corresponded to pairs of consecutive *abs* data versus *time*, within the range of *abs* values of 0.04 to 0.2. This range, which represents a very low *abs* values, was selected to avoid reaching the stationary phase, especially at limiting conditions.

Table 1. Kinetic parameters (λ and μ) of experiments from previous data of *Lactobacillus plantarum* and calculated K.

T (°C)	λ (h)	μ (h⁻¹)	K
8	30.2	0.0112	0.34
12	10.8	0.0334	0.36
16	6.5	0.0717	0.47
20	3.6	0.1151	0.41
30	1.8	0.2475	0.45

The growth rates obtained (μ Obs) (Equation 5) from CCRD (Table 2), were used to build the response surface model.

Table 2. Observed (Obs) and predicted growth rate (μ , h^{-1}) by response surface model (RSM) of *L. plantarum* for the central composite rotatable design.

T (°C)	pH	NaCl (%)	Na-lactate (%)	μ (h^{-1})	
				Obs ^b	RSM
7 (-1) ^a	6.0 (-1)	1.5 (-1)	1 (-1)	0.0042	0.0017
13 (+1)	6.0 (-1)	1.5 (-1)	1 (-1)	0.0498	0.0505
7 (-1)	7.0 (+1)	1.5 (-1)	1 (-1)	0.0040	0.0063
13 (+1)	7.0 (+1)	1.5 (-1)	1 (-1)	0.0549	0.0551
7 (-1)	6.0 (-1)	4.5 (+1)	1 (-1)	0	0
13 (+1)	6.0 (-1)	4.5 (+1)	1 (-1)	0.0316	0.0274
7 (-1)	7.0 (+1)	4.5 (+1)	1 (-1)	0	0.0045
13 (+1)	7.0 (+1)	4.5 (+1)	1 (-1)	0.0316	0.0320
7 (-1)	6.0 (-1)	1.5 (-1)	3 (+1)	0.0037	0.0013
13 (+1)	6.0 (-1)	1.5 (-1)	3 (+1)	0.0373	0.0349
7 (-1)	7.0 (+1)	1.5 (-1)	3 (+1)	0.0025	0.0059
13 (+1)	7.0 (+1)	1.5 (-1)	3 (+1)	0.0442	0.0395
7 (-1)	6.0 (-1)	4.5 (+1)	3 (+1)	0	0
13 (+1)	6.0 (-1)	4.5 (+1)	3 (+1)	0.0139	0.0118
7 (-1)	7.0 (+1)	4.5 (+1)	3 (+1)	0	0.0041
13 (+1)	7.0 (+1)	4.5 (+1)	3 (+1)	0.0096	0.0164
4 (-2)	6.5 (0)	3.0 (0)	2 (0)	0	0
16 (+2)	6.5 (0)	3.0 (0)	2 (0)	0.0541	0.0488
10 (0)	5.5 (-2)	3.0 (0)	2 (0)	0.0079	0.0136
10 (0)	7.5 (+2)	3.0 (0)	2 (0)	0.0323	0.0228
10 (0)	6.5 (0)	0 (-2)	2 (0)	0.0210	0.0306
10 (0)	6.5 (0)	6.0 (+2)	2 (0)	0.0033	0.0057
10 (0)	6.5 (0)	3.0 (0)	0 (-2)	0.0202	0.0262
10 (0)	6.5 (0)	3.0 (0)	4 (+2)	0.0047	0.0102
10 (0)	6.5 (0)	3.0 (0)	2 (0)	0.0207	0.0182
10 (0)	6.5 (0)	3.0 (0)	2 (0)	0.0209	0.0182
				RMSE	0.0084
				B_f	1.0518
				A_f	1.3690

^a Real values (coded values) for all variables; ^b average observed in quadruplicate.
RMSE: root mean square error; B_f: bias factor; A_f: accuracy factor.

Response surface model

Through the results of the CCRD (Table 2), it was possible to determine the regression coefficients to identify the variables showing the greatest influence on the *L. plantarum* growth rate. Table 3 shows only the factors that were statistically significant ($p < 0.10$), as well as their respective regression coefficients. The analysis of variance (ANOVA) is shown in Table 4.

Table 3. Regression coefficient results from the results of the central composite rotatable design (CCRD).

Model term	Regression coefficient	Standard error	t (19)	p-value
Mean/Interaction	0.018	0.001	15.889	<0.0001
1 T (L)	0.015	0.001	12.837	<0.0001
2 pH (L)	0.002	0.001	1.929	0.0688
3 NaCl (L)	-0.006	0.001	-5.227	<0.0001
4 Na-lactate (L)	-0.004	0.001	-3.357	0.0033
1L by 3L	-0.005	0.001	-3.649	0.0017
1L by 4L	-0.004	0.001	-2.611	0.0172

(L): linear factor.

Table 4: Analysis of variance (ANOVA) of the predictive model obtained for growth rate according to the CCRD.

Source of variations	Sum of squares	Df ^a	Mean square	F test ^b	p-value
Regression	0.007726	6	0.001288	37.88	<0.00001
Residual	0.000646	19	0.000034		
Total	0.008372	25			

^aDegree of freedom; ^bF test is the calculated value.

Determination coefficient (R^2) = 92.28%; $F_{6, 19; 0.1} = 2.11$ (tabulated).

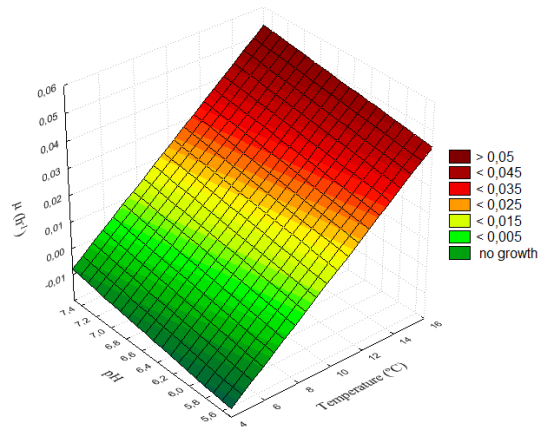
From Table 3, it is observed that temperature was the most important factor on the growth rate, followed by the concentrations of NaCl and of Na-lactate and by the pH. When temperature and pH increased, there was a corresponding increase in the growth rate (positive regression coefficient), whereas when the concentration of NaCl and Na-lactate increased in the culture medium, this growth parameter decreased (negative regression coefficient). In addition, the interactions between temperature and NaCl, and temperature and Na-lactate were statistically significant ($p < 0.10$).

The statistical significance of the model was checked by an F test (ANOVA) (Table 4). As the F test value was 37.88, 17.95 times higher than the F tabulated (2.11), it can show that the model is predictive, having high significance ($p < 0.00001$) and the percentage of variation explained by the model was 92.28%.

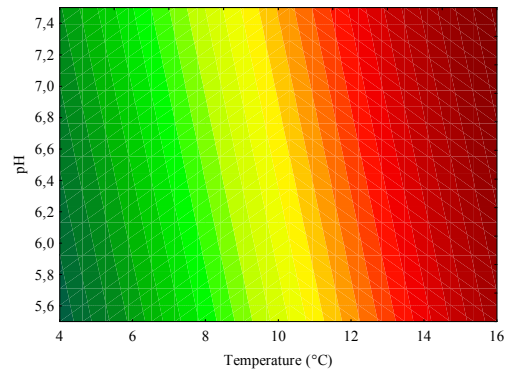
Through the results presented above it was possible to establish the response surface model as a function of statistically significant ($p < 0.10$) regression coefficients. The model for *L. plantarum* growth rate fitted in the coded factors is given by Equation 13.

$$\mu = 0.018 + 0.015 T + 0.002 \text{ pH} - 0.006 \text{ NaCl} - 0.004 \text{ Na-lactate} - 0.005 T \text{ NaCl} - 0.004 T \text{ Na-lactate} \quad (13)$$

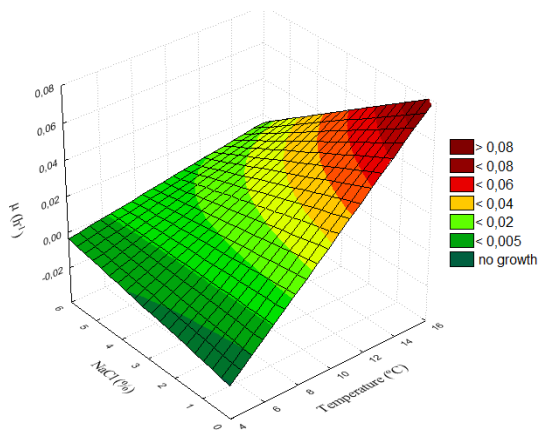
The predictive model (Equation 13) describes how the combined effects of temperature, pH, NaCl and Na-lactate influence the *L. plantarum* growth rate, considering $\mu = 0$ when $\mu < 0$. Figure 1 shows the response surface and contour curve plots for the growth rate of *L. plantarum*, as a function of temperature with pH, NaCl and Na-lactate.



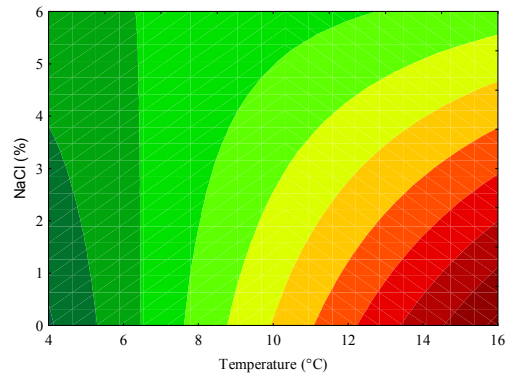
(a)



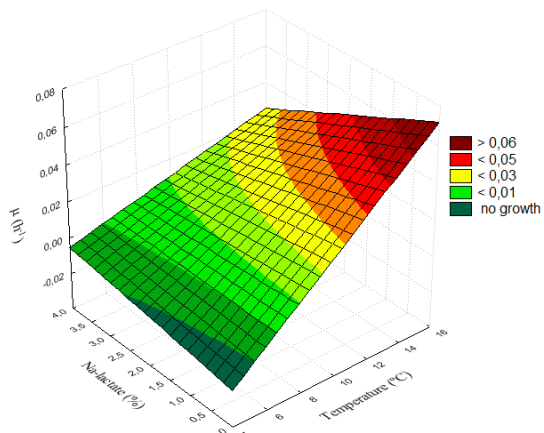
(b)



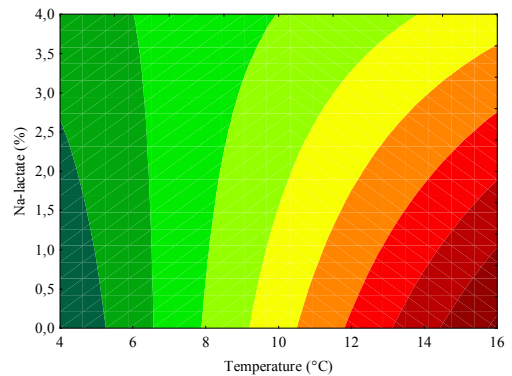
(c)



(d)



(e)



(f)

Figure 1. Response surfaces and contour curves for the growth rate (μ , h^{-1}) of *L. plantarum*, as a function of temperature ($^{\circ}\text{C}$) and pH (a) and (b), of the temperature ($^{\circ}\text{C}$) and NaCl (%) (c) and (d), and of the temperature ($^{\circ}\text{C}$) and Na-lactate (%) (e) and (f).

Analyzing firstly the response surface and the contour curve of Figure 1 a-b, it is possible to verify that under these conditions pH showed a small influence on the *L. plantarum* growth rate, and that at the higher values of this variable the microorganism growth was slightly higher. On the other hand, temperature was the factor that showed the largest effect on the response, as can be seen in Figure 1. At higher temperatures, the growth rate was higher. At the lowest temperature (4°C) and at some conditions at 7°C, there was no growth of microorganism during the studied period (six months), showing that the increase of this variable directly influenced the development of microorganism. The analysis between temperature and NaCl concentration had a significant influence on the decrease of *L. plantarum* growth rate (Figure 1 c-d). The same behavior can be observed in the interaction between temperature and Na-lactate (Figure 1 e-f), and in the presence of small concentrations of these compounds, the decrease in growth rate is already noticeable.

García-Gimeno et al. (2002) evaluated the effect of temperature (20 and 28°C), pH (4-7) and NaCl (0-6%) on the kinetic parameters of *L. plantarum* growth curves using RSM. All variables studied showed a significant effect ($p < 0.05$) on the growth rate. These results are in agreement with the results presented in this study, although the authors have not found a significant interaction between temperature and NaCl.

Devlieghere et al. (1999) established a predictive model to evaluate the effect of temperature (4, 8 and 12°C), water activity and dissolved CO₂ on *L. sakei* growth in brain heart infusion (BHI) broth. This model was extended with Na-lactate (0-3%) in BHI, and validated in meat products (Devlieghere et al., 2000). The interaction between Na-lactate and temperature was significant for the growth rate. These authors verified that the addition of Na-lactate extended the products' shelf life, especially at lower temperatures. According to Drosinos et al. (2006), the addition of 2% Na-lactate inhibits LAB growth in modified MRS and meat products, without causing changes in the flavor of the latter. Moreover, its inhibitory activity may increase when combined with other antimicrobials, such as NaCl and Na-acetate. In this study, the combined effect of the salts showed a greater inhibition on the growth rate when compared with the effect of each salt individually.

Sarmiento (2006) established a RSM with NaCl, Na-lactate, garlic and interactions between NaCl and polyphosphate, and polyphosphate and garlic for the evaluation of *L. plantarum* growth in MRS broth at 35°C. From the results in pure cultures, new formulations for smoked sausage and mortadella were proposed in order

to increase the shelf life of these products. These results show that the conclusions obtained in pure cultures could be used to guide the preparation of new formulations for meat products where different LAB microorganisms are present.

The obtained response surface model (Equation 13) was used to estimate the predicted values of growth rate shown in Tables 2 (μ , RSM). The table also shows the statistical factors that indicate the average deviations between observed and predicted values. The low value for the RMSE (0.0084) showed the acceptable prediction ability of the model. Ross (1996) introduced measures of model performance called B_f and A_f . Ideally, predictive models would have $A_f = B_f = 1$ but, typically, the accuracy factor will increase by 0.10 - 0.15 (10 - 15%) for every variable in the model (Ross et al., 2000). In this study, with four variables (temperature, pH, NaCl and Na-lactate), a value of $A_f = 1.4 - 1.6$ could be expected. Analyzing Table 2, the A_f value is 1.3690, demonstrating that the model can be used to predict *L. plantarum* growth rate with enough accuracy. The B_f value of 1.0518 confirms the good fit of the model proposed, being closer to 1. The 5% deviation of values observed means that the model overestimates μ , so predictions will be fail safe (Ross, 1996; Ross et al 2000).

Mathematical validation

There are two steps in evaluating a predictive model (Carrasco et al., 2006). The first one is to ensure that the model accurately describes the data from which it has been generated and the second step should be the comparison of the prediction with other data, also called model validation. For mathematical validation, 54 extra conditions were carried out within the domain of the model, and the observed and the predictive values by response surface model in these conditions are shown in Table 5. The table shows the same error criteria described in Table 2.

Table 5. Observed (Obs) and predicted growth rate (μ) by response surface model (RSM) of *L. plantarum* for mathematical validation.

T (°C)	pH	NaCl (%)	Na-lactate (%)	μ (h ⁻¹)	
				Obs ^a	RSM
16	6.0	0	1	0.0689	0.0918
16	7.0	0	1	0.0785	0.0963
16	6.5	0	3	0.0637	0.0476
16	6.5	1.0	2	0.0660	0.0711
16	6.5	2.0	1	0.0703	0.0715
16	6.5	2.0	4	0.0281	0.0366
16	6.0	3.0	0	0.0700	0.0696
16	7.0	3.0	0	0.0646	0.0742
16	6.0	3.0	4	0.0271	0.0232
16	7.0	3.0	4	0.0237	0.0278
16	6.5	4.0	1	0.0552	0.0492
16	6.5	4.0	3	0.0282	0.0260
16	6.5	5.0	2	0.0326	0.0263
16	6.0	6.0	0	0.0364	0.0359
16	7.0	6.0	0	0.0284	0.0405
13	7.0	0	0	0.0563	0.0744
13	7.0	0	4	0.0499	0.0432
13	6.5	0.5	3	0.0499	0.0448
13	6.5	2.5	2	0.0484	0.0373
13	6.5	3.0	0	0.0515	0.0490
13	6.5	3.0	4	0.0147	0.0178
13	6.5	3.5	2	0.0396	0.0296
13	7.0	6.0	0	0.0248	0.0283
10	7.0	0	0	0.0222	0.0409
10	7.0	0	4	0.0196	0.0249
10	6.0	1.0	1	0.0226	0.0281
10	7.0	1.0	1	0.0211	0.0327
10	6.0	2.0	3	0.0176	0.0160
10	7.0	2.0	3	0.0091	0.0206
10	7.0	3.0	2	0.0127	0.0205
10	6.5	4.0	0	0.0173	0.0220
10	6.5	4.0	1	0.0202	0.0181
7	7.0	0	0	0.0031	0.0074
7	7.0	0	4	0.0040	0.0066
7	6.5	0.5	3	0.0046	0.0042
7	6.5	2.5	2	0.0038	0.0032
7	6.5	3.0	0	0.0033	0.0033
7	6.5	3.5	2	0.0024	0.0026
7	6.5	3.0	4	0	0.0025

Table 5. continued.

T (°C)	pH	NaCl (%)	Na-lactate (%)	μ (h ⁻¹)	
				Obs	RSM
4	7.0	0	0	0	0
4	6.0	0	1	0	0
4	7.0	0	1	0	0
4	6.5	0	3	0	0
4	7.0	1.0	0	0	0
4	6.5	1.0	2	0	0
4	6.0	1.0	4	0	0
4	6.5	2.0	1	0	0
4	6.5	2.0	4	0	0
4	6.0	3.0	0	0	0
4	7.0	3.0	0	0	0
4	6.5	4.0	1	0	0
4	6.5	5.0	2	0	0
4	6.0	6.0	0	0	0
4	7.0	6.0	0	0	0
				RMSE	0.0080
				B_f	1.0863
				A_f	1.1808

^a average observed in quadruplicate;

RMSE: root mean square error; B_f: bias factor; A_f: accuracy factor.

The statistical indices calculated for the additional conditions (Table 5), showed values similar to those obtained by the experimental design (Table 2). The low value of RMSE indicates the good model prediction ability. The A_f value (1.1808) was lower when compared with the value of the experimental design (1.3690), having only 18% of variation between predicted and observed values. The B_f value was closer to 1, indicating minimal differences between the predicted and observed data. The results obtained in this study were similar to those described by other authors for validation of the model. García-Gimeno et al. (2003) obtained values of B_f= 1.09 and A_f= 1.27 in the validation of their RSM developed for *E. coli*, and Zurera-Cosano et al. (2006) showed values of B_f= 1.03 - 1.07 and A_f= 1.17 - 1.20 for validation of RSM of *L. mesenteroides* growth rate, in aerobic and anaerobic conditions.

4. Conclusion

The response surface model was developed with significant effects ($p < 0.10$) of temperature, NaCl, Na-lactate, pH and the interactions between temperature and NaCl, and temperature and Na-lactate on *L. plantarum* growth rate, where the temperature was the most decisive factor, followed by the concentrations of NaCl and Na-lactate and by

the pH. The goodness of fit of the model was confirmed through mathematical validation by statistics indices RMSE, B_f and A_f factors.

The developed model could be useful in predicting *L. plantarum* growth rate in foods with a composition similar to factors described in this paper.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the Capes Foundation (Brazil) for the financial support of Francieli Dalcanton for her Ph.D. studies and both the Department of Food Science and Technology of the University of Córdoba (Córdoba, Spain) and the Junta de Andalucía/Project P08-CTS 3620, for the financial support to carry out this research.

References

- Antwi, M.; Theys, T.E.; Bernaerts, K.; Van Impe, J.F.; Geeraerd, A.H. 2008. Validation of a model for growth of *Lactococcus lactis* and *Listeria innocua* in a structured gel system: Effect of monopotassium phosphate. *International Journal of Food Microbiology* 125, 320–329.
- Augustin, J.C., Rosso, L., Carlier, V. 1999. Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods* 38, 137–146.
- Baranyi, J., Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.
- Barros Neto, B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E. 1995. Planejamento e otimização de experimentos. Second edition. Unicamp editor. Campinas, SP, Brazil.
- Borch, E., Kant-Muemansb, M.L., Blixt, Y. 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 103-120.
- Brul, S., Mensonides, F.I.C., Hellingwerf, K.J., Mattos, M.J.T. 2008. Microbial systems biology: new frontiers open to predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology* 128, 16-21.
- Buchanan, R.L., Whiting, R.C., Damert, W.C. 1997. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiology* 14, 313-326.

Cayré, M.E., Vignolo, G., Garro, O. 2003. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsion stored at three temperatures. *Food Microbiology* 20, 561-566.

Carrasco, E., García-Gimeno, R., Seselovsky, R., Valero, A., Pérez, F., Zurera-Cosano, G., Todd, E. 2006. Predictive model of *Listeria monocytogenes* growth rate under different temperatures and acids. *Food Science and Technology International* 12, 47-56.

Chandler, R.E., McMeekin T.A. 1985. Temperature function integration and its relationship to the spoilage of pasteurized, homogenized milk. *Australian Journal of Dairy Technology* 40, 37-41.

Cooper, K.E. 1963. The theory of antibiotic inhibition zones. In: *Analytical microbiology*, F. Kavanagh (Ed.), Academic Press, New York.

Dalgaard, P., Koutsoumanis, K. 2001. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of Microbiological Methods* 43, 183-196.

Devlieghere, F., Geeraerd, A.H., Versyck, K.J., Bernaert, H., Van Impe, J.F., Debevere, J. 2000. Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of Na-lactate as a fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. *International Journal of Food Microbiology* 58, 93–106.

Devlieghere, F., Van Belle, B., Debevere, J. 1999. Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *International Journal of Food Microbiology* 46, 57-70.

Drosinos, E.H., Mataragas, M., Kampani, A., Kritikos, D., Metaxopoulos, I. 2006. Inhibitory Effect of Organic Acid Salts on Spoilage Flora in Culture Medium and Cured Cooked Meat Products Under Commercial Manufacturing Conditions. *Meat Science*, 73, 75-81.

Franco, B.G.M.F.; Landgraf, M. 1996. *Microbiologia dos alimentos*. Atheneu editor, São Paulo, SP, Brazil.

Franz, C.M.A.P., Von Holy, A. 1996. Thermotolerance of meat spoilage lactic acid bacteria and their inactivation in vacuum-packaged vienna sausages. *International Journal of Food Microbiology* 29, 59-73.

García-Gimeno, R.M., Martínez, C.H., Silóniz, M.I. 2002. Improving artificial neural networks with a pruning methodology and genetic algorithms for their application in microbial growth prediction in food. *International Journal of Food Microbiology* 72, 19-30.

- García-Gimeno, R.M., Hervás-Martínez, C., Barco-Alcalá, E., Zurera-Cosano, G., Sanz-Tapia, E. 2003. An artificial neural network approach to *Escherichia coli* O157:H7 growth estimation. *Journal of Food Science* 68, 639–645.
- Gospavic, R., Kreyenshimidt, J., Bruckner, S., Popov, V., Haque, N. 2008. Mathematical modeling for predicting the growth of *Pseudomonas* spp. in poultry under variable temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology* 127, 290-297.
- Haaland, P.D. 1989. *Experimental Design in Biotechnology*. Marcel Dekker, INC., New York, USA.
- Hugas, M. 1998. Bacteriocinogenic lactic bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science* 49, 139-150.
- Liu, H.L., Lan, Y.W., Cheng, Y.C. 2004. Optimal production of sulphuric acid by *Thiobacillus thiooxidans* using response surface methodology. *Process Biochemistry* 39, 1953-1961.
- Mancini, R.A., Ramanathan, R., Suman, S.P., Konda, M.K.R., Joseph, P., Dady, G.A., Naveena, B.M., López-López, I. 2010. Effects of lactate and modified atmospheric packaging on premature browning in cooked ground beef patties. *Meat Science* 85, 339–346.
- Massaguer, P.R. 2005. *Microbiologia dos processos alimentares*. Varela editor, São Paulo, SP, Brazil.
- Mataragas, M., Drosinos, E.H., Vaidanis, A., Metaxopoulos, I. 2006. Development of a Predictive Model for Spoilage of Cooked Cured Meat Products and Its Validation Under Constant and Dynamic Temperature Storage Conditions. *Journal of Food Science* 71, 157-167.
- McDonald, K., Sun, D.W. 1999. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 52, 1–27.
- Messens, W., Verluyten, J., Leroy, F., Vuyst, L. 2003. Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *International Journal of Food Microbiology* 81, 41–52.
- Nasrabadi, M.R.N., Razavi, S.H. 2010. Use of response surface methodology in a fed-batch process for optimization of tricarboxylic acid cycle intermediates to achieve high levels of canthaxanthin from *Dietzia natronolimnaea* HS-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109 (4), 361-368.

- Neumeyer, K., Ross, T., McMeekin, T.A. 1997. Development of a predictive model to describe the effects of temperature and water activity on the growth of spoilage pseudomonads. *International Journal of Food Microbiology* 38, 45–54.
- Nychas, G.J.E.; Skandamis, P.N.; Tassou, C.C.; Koutsoumanis, K.P. 2008. Meat spoilage during distribution. *Meat Science* 78, 77-89.
- Pexara, E.S., Metaxopoulos, J., Drosinos, E.H. 2002. Evaluation of shelf life of cured, cooked, sliced turkey fillets and cooked pork sausages - piroski - stored under vacuum and modified atmospheres at +4 and +10°C. *Meat Science* 62, 33-43.
- Rao, M.S., Pintado, J., Stevens, W.F., Guyot, J.P. 2004. Kinetic growth parameters of different amylolytic and non-amylolytic *Lactobacillus* strains under various salt and pH conditions. *Bioresource Technology* 94, 331–337.
- Rodrigues, M.I., Iemma, A.F. 2005. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Casa do Pão editor. Campinas, SP, Brazil
- Rodríguez-Pérez, M.R. 2004. Desarrollo y validación de modelos matemáticos para la predicción de vida comercial de productos cárnicos. PhD Thesis. Food Science and Technology Graduation Program, UCO. Córdoba, Spain.
- Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology* 81, 501-508.
- Ross, T., Dalgaard, P., Tienungoon, S. 2000. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *International Journal of Food Microbiology* 62 231–245.
- Rosso, L. 1995. Modélisation et microbiologie prévisionnelle: élaboration d'un nouvel outil pour l'agro-alimentaire. Thèse de doctorat no. 197-95, Université Claude Bernard-Lyon I.
- Sallam, K.I. 2007. Chemical, sensory and shelf life evaluation of sliced salmon treated with salts of organic acids. *Food Chemistry* 101, 592–600.
- Samelis, J., Kakouri, A., Rementzis, J. 2000. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *Food Microbiology* 17, 329-340.
- Sarmiento, C.M.P. 2006. Modelagem do Crescimento Microbiano e Avaliação Sensorial no estudo da Vida de Prateleira de mortadela e lingüiça defumada em armazenamento isotérmico e não isotérmico. PhD Thesis. Chemical Engineering Graduation Program, UFSC, Florianópolis, Brazil.
- Slongo, A.P., Rosenthal. A., Camargo, L.M.Q., Deliza, R., Mathias, S.P., Aragão,

- G.M.F. 2009. Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. *Food Science Technology* 42, 303-306.
- Sutton, D.S., Brewer, M.S., McKeithz, F.K. 1997. Effects of sodium lactate and sodium phosphate on the physical and sensory characteristics of pumped pork loins. *Journal of Muscle Foods* 8, 95-104.
- Valero, A., Hervás, C., García-Gimeno, R.M., Zurera-Cosano, G. 2007. Product unit neural network models for predicting the growth limits of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* 24, 452-464.
- Zhou, G.H., Xu, X.L., Liu, Y. 2010. Preservation technologies for fresh meat – A review. *Meat Science* 86, 119-128.
- Zurera-Cosano, G., García-Gimeno, R.M., Rodríguez-Pérez, R., Hervás-Martínez C. 2006. Performance of response surface model for prediction of *Leuconostoc mesenteroides* growth parameters under different experimental conditions. *Food Control* 17, 429-438.
- Zurera-Cosano, G., García-Gimeno, R.M., Rodríguez-Pérez, M.R., Hervás-Martínez C. 2005. Validating an artificial neural network modelo of *Leuconostoc mesenteroides* in vacuum packaged sliced cooked meat products for shelf life estimation. *European Food Research and Technology* 221, 717-724.

4.3.2 Informações complementares

A Figura 4.9 apresenta um exemplo de curvas de crescimento de *L. plantarum* cultivada no Bioscreen C, com leituras de absorvância a cada 1 h durante 24 dias. Este exemplo é referente ao ensaio a 16°C do DCCR (pH= 6,5, NaCl= 3% e Na-lactato= 2%), realizado em quadruplicata. Este ensaio gerou 576 dados experimentais. A *abs* no gráfico representa apenas as bactérias em suspensão, onde a *abs* dos brancos (duplicata) foram subtraídas. Como pode ser observado, as quatro réplicas apresentaram valores semelhantes.

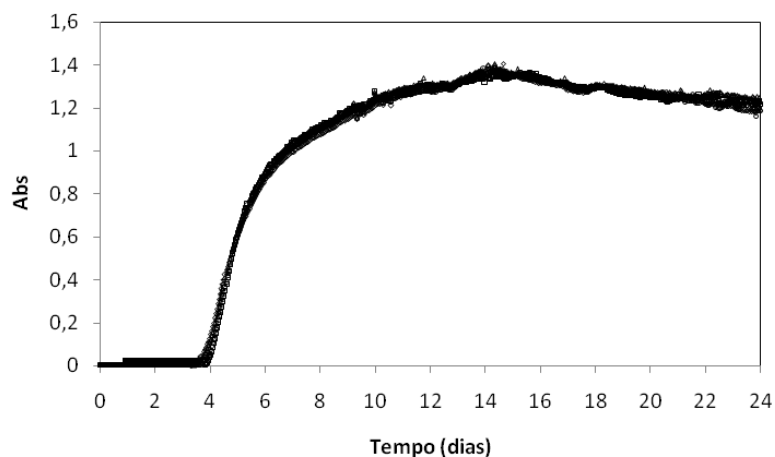


Figura 4.9. Curvas de crescimento de *Lactobacillus plantarum* cultivada a 16°C, pH= 6,5, NaCl= 3% e Na-lactato= 2% em quadruplicata.

A Figura 4.10 apresenta a relação entre a concentração celular ($\text{Log } N_{10}$ (UFC/mL)) e os dados de absorvância de *L. plantarum* a 30°C. Como na Figura 4.9, a *abs* foi subtraída do branco. A equação linear obtida foi apresentada na Equação 12 do artigo.

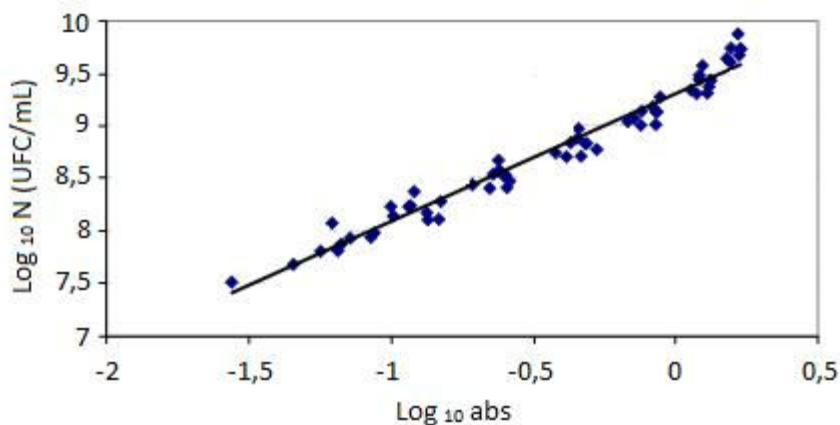


Figure 4.10. Relação entre a concentração celular ($\text{Log } N$ (UFC/mL)) e os dados de absorvância (Log_{10} abs) de *Lactobacillus plantarum* a 30°C.

Os dados gerados pelo DCCR foram analisados primeiramente com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), com isto a variável pH não foi significativa, apresentando um valor de $p = 0,052$. Por este valor ser muito próximo ao limite estabelecido e observando as respostas obtidas pelo desenho experimental, onde pode ser observado

que há diferenças nas velocidades de crescimento dependendo do nível de pH, optou-se por baixar o nível de confiança para 90% ($p < 0,10$).

A Figura 4.11 apresenta as tendências dos valores preditos pelo modelo da superfície de resposta nas condições do delineamento experimental (Figura 4.11- a) e nas condições da validação matemática (Figura 4.11- b). Pela análise das figuras, é possível perceber que os valores observados e preditos estão próximos à linha de tendência, ou seja, pouco dispersos, levando em consideração que as unidades das velocidades de crescimento de *L. plantarum* são pequenas.

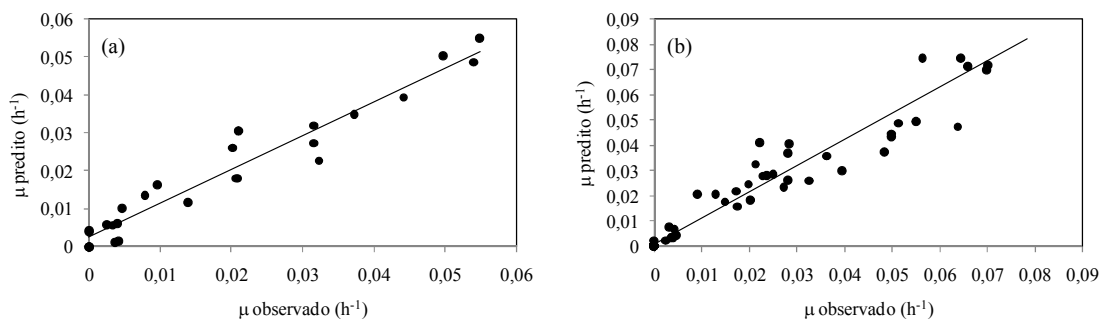


Figura 4.11. Representação gráfica da velocidade de crescimento (h^{-1}) observada e predita pelo modelo da superfície de resposta, nas condições do delineamento experimental (a) e nas condições da validação matemática (b).

4.3.3 Nomenclatura

LAB ou BAL	Bactéria ácido láctica
CFU ou UFC	Unidades formadoras de colônias
MRS	Meio de cultivo (Man, Rogosa e Sharpe)
Abs	Absorbância
RSM ou MSR	Modelo de superfície de resposta
CCRD ou DCCR	Delineamento composto central rotacional
Log ₁₀	Logaritmo decimal
N	Concentração celular (UFC/mL)
N ₀	Concentração celular inicial (UFC/mL)
T	Tempo (h)
p, q	Pontos quaisquer da fase exponencial
T	Temperatura (°C)
λ	Duração da fase lag (h)
μ	Velocidade específica máxima de crescimento (h ⁻¹)
K	Constante específica do micro-organismo
RMSE	Raiz do erro médio quadrático
B _f	Fator bias
A _f	Fator exatidão
Obs	Valor observado
Pred	Valor predito
R ²	Coefficiente de determinação
a, b	Coefficientes do modelo

4.4 Modelagem matemática do crescimento de *Lactobacillus plantarum* em *chopped* suíno cozido embalado a vácuo e armazenado em diferentes temperaturas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar e modelar o crescimento de *Lactobacillus plantarum* inoculado em fatias de *chopped* embaladas a vácuo sob diferentes temperaturas de armazenamento (4, 10 e 16°C), e estudar a relação entre o crescimento deste micro-organismo e a qualidade sensorial do produto cárneo analisado.

Ao final do capítulo estão incluídas algumas informações complementares referentes à influência da temperatura nos parâmetros de crescimento de *L. plantarum* no produto cárneo (modelos secundários) e a predição do crescimento deste micro-organismo sob condições não isotérmicas. Também é apresentado um estudo prévio realizado com a microbiota do *chopped* embalado a vácuo em condições de aerobiose e anaerobiose, onde o crescimento de BAL foi analisado.

4.4.1 Artigo 4: Growth modeling of *Lactobacillus plantarum* in vacuum-packaged cooked chopped pork at different temperatures

Abstract

The main microorganisms responsible for the spoilage of refrigerated meat products are lactic acid bacteria (LAB). During storage, temperature is the most important parameter affecting these products' shelf life. *L. plantarum* growth in a vacuum-packaged cooked meat product under different storage temperatures (4, 10 and 16°C) and the relation between microorganism growth and sensory quality were investigated. The Gompertz model was fitted to experimental counts in order to obtain the growth parameters, i.e., lag phase duration (λ), maximum specific growth rate (μ) and maximum population density (MPD). The organoleptic and visual attributes (color, flavor, taste, appearance) were also evaluated due to their importance to the global quality (Q). The Gompertz model fitted well to growth curves of *Lactobacillus plantarum*. The sensorial deterioration was detected several days after LAB reached the stationary. Finally, in this study, it was not found any relation between shelf-life and certain concentration level of LAB.

Keywords: cooked meat product, *Lactobacillus plantarum*, mathematical modeling, temperature.

1. Introduction

The deterioration of food products due to spoilage microorganisms is a highly important problem, which affects both the food industry and consumers (Zurera-Cosano et al., 2006). The behavior of microbial populations in foods (growth, survival and death) is determined by the food properties (e.g., water activity, pH and nutrients) and storage conditions (e.g., temperature, relative humidity and atmosphere) (Nakashima et al., 2000). Lactic acid bacteria (LAB) were identified as a major spoilage population of vacuum-packaged and modified atmosphere packaged meat products, and other processed products stored under refrigeration temperatures (Borch et al., 1996; Hugas, 1998). Meat and meat products spoilage caused by the growth of lactic acid bacteria and biochemical reactions can cause discoloration, texture changes, slime formation, rancidity, development of off-odors and off-flavors in these products (Samelis et al., 2000; Mataragas et al., 2006).

Many strategies are used by the food industry to guarantee quality and safety of its foods, like temperature control throughout the distribution in the chill chain. This is very important to avoid rapid and uncontrollable microbial growth, which reduces product shelf life and may endanger public health (Nychas et al., 2008). Another important control factor is the atmosphere in which foods are packaged (Pexara et al., 2002). Vacuum-packaging (VP) and modified atmosphere packaging (MAP) are protective technologies which have been widely applied to meat and meat products to extend their shelf-lives, retarding the development of oxidative processes and microbial growth (Gray et al., 1996; Koutsoumanis et al., 2008).

The need of assuring microbiological safety and high quality foods has been stimulating the application of predictive microbiology tools (Nakashima et al., 2000). Predictive microbiology has focused on understanding the effect of intrinsic and extrinsic parameters on the growth of pathogenic and spoilage microorganisms. The behavior of these microorganisms is quantitatively described with the development and application of mathematical models. These models may be used to predict the shelf life of foods based on the growth of spoilage microorganisms and can also help in developing new products, evaluating the microbial growth, with changes in the composition or processing of the food (McDonald and Sun, 1999). During the last decade, a significant number of mathematical models to describe the growth of various spoilage bacteria in meat product has been published, with applications to sausages,

cooked chicken breast, sliced pork, among others (Cayré et al., 2003; Rodríguez-Pérez et al., 2003; Liu et al., 2006).

Sensory and microbiological analyses are the most often used tools to evaluate the freshness and safety conditions of meat and meat products. Sensory analysis plays an important role in the evaluation and interpretation of properties of foods (texture, flavor, appearance and color), depending on their chemical composition, processing, packaging and storage conditions. The food industry uses sensory analysis as an essential tool for the development, quality control and evaluation of the market potential of a particular food (Stone and Sidel, 2004).

The objectives of this study were i) to estimate the growth of *Lactobacillus plantarum* as a spoilage microorganism on slices of cooked chopped pork under different storage temperatures (4, 10 and 16°C) and ii) to study the relation between *L. plantarum* growth and product sensory quality.

2. Material and methods

2.1. Samples

The products used in this study were taken from cooked chopped pork preserved cans with an average weight of 2.2 kg (in each package) provided by a Spanish industry (Córdoba, Spain). Chopped pork is a product ready for consumption, prepared with pork meat (65%), water, curing ingredients, food-grade salt and sodium nitrite.

The product was sliced aseptically in a household slicer with a polished stainless steel blade (Demoka™, M-381 Zeta Plus Ø, Italy) which was disinfected with 70% (v/v) ethanol for 10 min prior to its use. The obtained slices, which weighed approximately 25 g, were placed in plastic film bags (Sacoliva, Barcelona, Spain). Then, samples were inoculated with a subculture of *Lactobacillus plantarum* to obtain almost 10³ CFU/g, prepared as described in Section 2.1.2. Non-inoculated samples were used as control. Finally, the samples were vacuum-packaged by using a packer (Audionvac 151 HG, Weesp, Holland) and subsequently stored at different temperatures (4, 10 and 16°C).

To verify the effectiveness of the disinfection process of the slicer, Plate Count Agar (PCA, Oxoid Ltd., Hampshire, England) and MRS agar (Oxoid Ltd., Hampshire, England) Rodac plates were put in contact with three different surface zones of the slicing machine, including the blade, and incubated at 30°C for 48 h and 30°C for 48 h

in 10% CO₂ for PCA and MRS, respectively.

2.1.2. Inoculum preparation and inoculation of the chopped pork

The strain of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 was taken from the Spanish Collection of Strain Types (Valencia, Spain). The strain was maintained at -18°C in cryovials containing beads and cryopreservative (Microbank™). Two days before the experiment, a bead of the strain was transferred into a tube with 10 mL of MRS broth (Oxoid Ltd., Hampshire, England) and incubated at 30°C for 24 h in 10% CO₂ (Crenesys Instrumentation, Madrid, Spain). Then, 1 mL of the initial subculture was pipetted into a flask containing 100 mL of MRS broth and incubated for 18 h at 30°C. After this period, the strain was washed by centrifugation at 4000 rpm (Jouan C4i, Thermo Electron Corporation, France) for 10 min, and this process was repeated twice with the use of a 0.85% saline solution (Panreac, Barcelona, Spain). Then, necessary decimal dilutions were made to obtain an initial inoculum of about 10³ CFU/g on the surface of each slice of meat product, which was spread evenly on the slice by using a sterile glass rod.

2.2. Microbiological and physical-chemical analysis

Prior to the microbiological analysis, the pH was measured directly on three different points in each slice of product by using a pHmeter (pH/mv-meter digit 501, Crison, Barcelona, Spain). Then, 25 g of meat product (from 1 slice) was aseptically transferred into a sterile stomacher bag. Next, 225 mL of 0.1% peptone solution (Oxoid Ltd., Hampshire, England) was added and the sample was homogenized for 60 s in a Stomacher 400 (Lab Blender, Seward, London, England). Decimal dilutions were made with 0.85% saline solution, when needed, and plated in duplicate. Lactic acid bacteria were counted by using the pour plate method, MRS agar was incubated at 30°C for 48 h in an incubator with 10% CO₂. The plates were examined visually for typical colonies. Each microbiological determination was performed in triplicate (i.e., three samples) and the results were expressed as the average colony forming units per gram (CFU/g). The determination of the sampling time depended on the storage temperature and microbial growth evolution.

Detection and enumeration of pathogenic and hygienic indicators microorganisms were performed on analyzed samples. *Escherichia coli* β-

Glucuronidase was enumerated by using a Most Probable Number (MPN) method in 9 mL tubes of Lauryl Tryptose broth supplemented with MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide) as established by the AOAC Official Method 992.30. Investigation and enumeration of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes*, and investigation of *Salmonella* spp. were performed according to UNE-EN ISO 11290-2 (2000) and UNE-EN ISO 6579 (2002), respectively.

2.3. Sensorial analysis and shelf-life determination

The evaluation was performed by a trained sensory panel (8-10 members) by using a descriptive test. The main organoleptic and visual attributes (color, odor, taste, appearance and general acceptance) were evaluated in facilities under a standard test room according to UNE ISO 87-004-79 (1997). A glossary was prepared containing terms relating to an intensity scale. The scale followed a numerical representation that considers the severity of the evaluation by using a hedonic scale from 1 to 9 (1 = disliked very much; 9 = liked very much) which was based on the Karlsruhe Scale (Witting de Penna, 1981; Anzaldúa-Morales, 1994). A hedonic grade of 5 was chosen to indicate the start of the product deterioration, therefore, samples with values below 5 were considered unacceptable.

The global quality (Q) was calculated based on the methodology applied by Bruna et al. (2001), by using the following Equation 1:

$$\text{Overall } Q = (\text{Color} \times f_1) + (\text{Appearance} \times f_2) + (\text{Odor} \times f_3) + (\text{Taste} \times f_4) \quad (1)$$

where *Color*, *Appearance*, *Odor* and *Taste* corresponded to mean scores for each attribute obtained by sensory analysis and f_i was a value between 0 and 1, with $f_1 + f_2 + f_3 + f_4 = 1$, which accounts for the degree of importance of the corresponding attribute.

This expression was calculated based on the opinion of the panelist by assigning the following values for f_i : 0.37 for color, 0.33 for appearance; 0.10 for odor and 0.20 for taste. The degree of importance was also confirmed by analysis of the correlation between the values of the different attributes and general acceptance. A linear regression was performed on the Q values calculated during storage for each temperature. To estimate the shelf-lives at the different temperatures, the deterioration

limit (Q=5) was determined by interpolation from the regression equation obtained for Q.

2.4. Modeling of growth data

Gompertz model (Gibson et al., 1987) was fitted for *Lactobacillus plantarum* growth data obtained in vacuum-packaged cooked chopped pork (Log N) using the DMFit program (Excel Add-In) (Baranyi and Roberts, 1994) to estimate the kinetic parameters. The Gompertz model is represented by Equation 2.

$$\text{Log}N = N_0 + A \exp\{-\exp[-B(t - M)]\} \quad (2)$$

where Log N is the decimal logarithm of microbial counts (CFU/g) at time t , N_0 is the asymptotic log count as time decreases indefinitely (approximately equivalent to the log of the initial bacteria counts) (CFU/g), A is the log count increment as time increases indefinitely (CFU/g), B is the relative growth rate at time M (h^{-1}), M is the time required to reach the maximum growth rate (h).

From these parameters, the following derived parameters were obtained: the maximum growth rate ($\mu = B \cdot A / e$ (h^{-1})), with $e = 2.7182$, the lag phase duration ($\lambda = M - (1/B)$ (h)), and the maximum population density ($\text{MPD} = N_0 + A (\text{Log}(\text{CFU/g}))$).

2.5 Statistical analysis

Descriptive statistics of microbiological data and checklist scores were applied with Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, Wash.). In addition, Pearson correlation coefficient (r) and regression analysis were performed by means of SPSS 8.0 software (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA).

The goodness of fit of the Gompertz model was assessed by the correlation coefficient (R^2) and mean square error (MSE) (Equation 3) (Sutherland et al., 1994). The smaller the MSE value, the better the model fitted the data.

$$\text{MSE} = \frac{\sum (\text{Value}_{\text{observed}} - \text{Value}_{\text{predicted}})^2}{n - p} \quad (3)$$

where n is the number of experimental points and p is the number of model parameters.

3. Result and discussion

Microbial growth

The *Lactobacillus plantarum* initial counts on the inoculated samples were $3.77 \log_{10}$ CFU/g (± 0.03) at 4 and 10°C , and $3.44 \log_{10}$ CFU/g (± 0.56) at 16°C . At the end of the storage time, inoculated samples reached $5.25 \log_{10}$ CFU/g, $7.61 \log_{10}$ CFU/g and $8.09 \log_{10}$ CFU/g at 4, 10 and 16°C , respectively. Moreover, control samples (non-inoculated samples) showed a very low initial count (almost zero) and were monitored in parallel. Microbiological analysis on samples indicated, in addition, that no pathogen species were detected, and no samples were positive for *E. coli*.

Lactobacillus plantarum growth data on slices of vacuum-packaged cooked chopped pork at different temperatures (4, 10 and 16°C) were fitted with the Gompertz model (Figure 1). The obtained growth parameters (λ , μ and MPD), along with fitting-goodness indices for the fitted model are shown in Table 1.

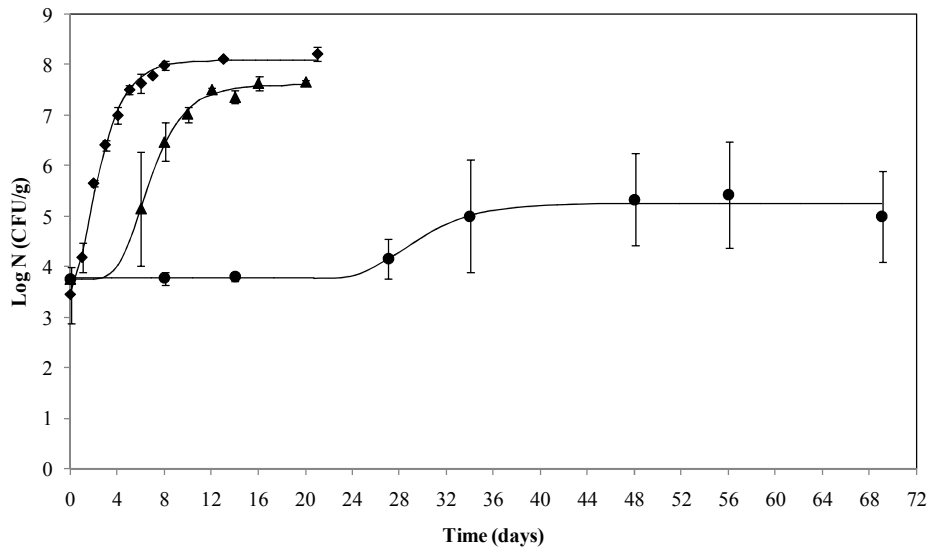


Figure 1. *Lactobacillus plantarum* growth curves fitted by Gompertz model in slices of vacuum-packaged cooked chopped pork at different storage temperatures. The lines represent the Gompertz model fitted to experimental data (symbols). (●) 4°C , (▲) 10°C and (◆) 16°C . Bars represent the standard deviation.

Table 1. *Lactobacillus plantarum* growth parameters and statistical indices obtained by fitting the Gompertz model to the growth curves determined at different temperatures for vacuum-packaged cooked chopped pork.

T (°C)	Growth parameters*			Statistical indices	
	λ	μ	MPD	R ²	MSE
4	591.23	0.007	5.25	0.9511	0.0208
10	95.35	0.029	7.61	0.9931	0.0033
16	0	0.047	8.09	0.9907	0.0221

* λ (h), μ (h⁻¹) and MPD (log₁₀ CFU/g)

Figure 1 shows that the behavior of *L. plantarum* at different temperatures was well described by the Gompertz model, which was confirmed through the correlation coefficients (R²) and small values of MSE. The growth curve determined at 10°C showed the best fit, with R² = 0.9931 and MSE = 0.0033, followed by the curve determined at 16°C, while the lowest correlation coefficient was observed for the growth curve determined at 4°C (0.9511), despite its small MSE (0.0208). The Gompertz model is widely used in literature to fit microbial growth curves obtained in meat products, such as sliced ham (Slongo et al., 2009), sausage (Cayré et al., 2003, 2005), beef (Giannuzzi et al., 1998; Muermans et al., 1993), among others.

The temperature increase led to the decrease of the lag phase duration (λ), along with the increase of the maximum specific growth rate (μ) and of the maximum population (MPD). The counts variability (i.e., standard deviation) observed for some growth data at 4°C could be the consequence of a major variability of cells to adapt to more stringent conditions (i.e., low temperatures). Nevertheless, bacteria behavior showed large differences between 4°C and 10°C, despite the refrigeration temperature suggested for the conservation of meat products being in this range. The lag phase at 4°C was approximately 25 days (591.23 h), while at 10°C this parameter decreased dramatically to 4 days (95.35 h). When growth was at abuse temperature (i.e., 16°C), there was no lag phase, as shown in Figure 1 and Table 1. A large difference also occurred on the μ parameter, rising from 0.007 (h⁻¹) to 0.029 (h⁻¹) when the temperature increased from 4 to 10°C, respectively, meaning an increase by about 4 times (Table 1).

In this study, the stationary phase was reached after almost 8, 12 and 36 days at 16°C, 10°C and 4°C, respectively. As it can be seen in Table 1, at 4°C the maximum population did not reach 7 log₁₀ CFU/g, which is considered as the microbiological criterion to establish shelf life in refrigerated meat products (Ruiz-Capillas et al., 2007;

Koutsoumanis et al., 2008; Slongo et al., 2009). The count reached 5.25 log₁₀ CFU/g in 70 days at this lower temperature. At 10°C and 16°C, maximum populations were 7.6 log₁₀ CFU/g and 8.09 log₁₀ CFU/g, achieving 7 log₁₀ CFU/g in 10 and 4 days of storage, respectively.

Cayré et al. (2003) investigated the effect of three storage temperatures on LAB growth in vacuum-packaged cooked meat emulsions. The periods needed to reach the stationary phases (> 7 log₁₀ CFU/g) were 8, 14 and 25 days, while the growth rates were 0.048, 0.027 and 0.017 h⁻¹ at 15°C, 8°C and 0°C, respectively. The μ parameter and times elapsed until the stationary phases for the higher temperatures are in agreement with the current study, but the behavior at the lower temperature was not similar between studies, as LAB in samples at 0°C reached levels > 7 log₁₀ CFU/g, in addition to showing a shorter lag phase and higher growth. The difference observed between studies can be due to both the distinct LAB species composition in the analyzed products and the interaction of different intrinsic and extrinsic factors, specific for each product, such as different concentration of nutrients, salt, preservatives, pH, water activity, temperature, packaging conditions, among others. Samelis et al. (2000) determined the selective effect of the product type and the packaging conditions (vacuum or air) on the types of LAB. When sliced, vacuum packed cooked ham, turkey breast fillet, smoked pork loin, bacon, pariza and mortadella from the same processing environment and day of manufacture were stored at 4°C, both the growth rate and the composition of the spoilage flora differed significantly between the products.

Physical-chemical analysis

The pH value of the meat product was also monitored during the storage. Figure 2 shows the correlation between pH mean values and *Lactobacillus plantarum* counts for slices of vacuum-packaged cooked chopped pork for each storage temperature. The mean initial pH value of all samples was 6.27 (\pm 0.01). During storage of this meat product at three different temperatures, the pH values remained nearly constant until *L. plantarum* reached a value of 7 log₁₀ CFU/g. At this point, the pH values of the samples started to decrease. At the end of storage, the pH value reached 5.70 (\pm 0.04) and 6.06 (\pm 0.05) at 16 and 10°C, respectively and 6.2 (\pm 0.03) at 4°C, which practically did not change with respect to the initial value. Spoilage lactic acid bacteria produce mostly lactic and acetic acid during logarithmic growth and the stationary phase, producing a

pH reduction in the product (Korkeala and Bjorkroth, 1997). These results are in agreement with those reported by Kreyenschmidt et al. (2010), who investigated the shelf life of sliced cooked ham based on the LAB growth stored under different temperature conditions (2 to 15°C). These authors reported that during storage, the pH value remained invariable until LAB reached a value of 7.5 log₁₀ CFU/g.

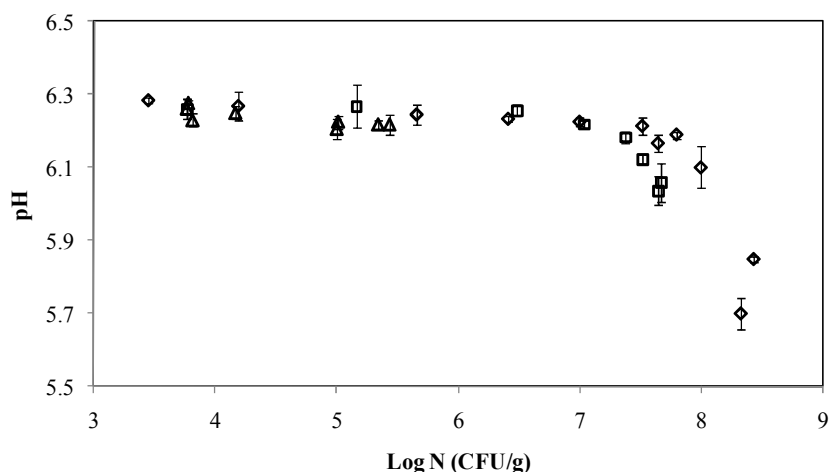


Figure 2. Behavior of pH values during the growth of *Lactobacillus plantarum* (CFU/g) in slices of vacuum-packaged cooked chopped pork at different storage temperatures: 4°C (Δ), 10°C (\square) and 16°C (\diamond). Bars show the standard deviation.

Sensory analysis

Table 2 shows scores during storage for the different sensorial attributes evaluated in this study. The most sensitive attributes were color and odor, for samples at 4°C ($r = -0.97$), and 10°C and 16°C ($r = -0.96$) (data not shown), respectively, which experienced a significant reduction during storage.

Correlation analysis of attributes used for Q (odor, color, taste and appearance) confirmed that these attributes were strongly correlated to the general acceptance ($r = 0.76 - 0.99$) (data not shown). A regression analysis was performed on global quality scores and storage times, resulting in a decreasing straight line for all assayed temperatures, with R^2 of 0.891, 0.761 and 0.802 at 4, 10 and 16°C, respectively, as shown in Figure 3. The slopes of the straight lines decreased as temperature increased, being -0.054, -0.066, and -0.111 for samples at 4, 10, 16°C, respectively. From the straight line equations, by utilizing the established deterioration threshold (i.e., 5), shelf life could be estimated based on the sensory quality of samples. Shelf-life estimations

corresponded to 59, 45 and 25 days for 4, 10 and 16°C, respectively. These estimations indicated that the shelf-lives were on the late stationary phase of the growth curves, i.e., 32, 33 and 15 days after the maximum population density was reached, respectively. These results suggest that the maximum population density was not the factor responsible for the spoilage of the studied product.

Table 2. Sensorial attributes mean for vacuum-packaged cooked chopped pork at different storage temperatures (4, 10 and 16°C).

Sensory Analysis													
ATTRIBUTE		0 Days	5 Days	12 Days	19 Days	26 Days	33 Days	37 Days	40 Days	47 Days	58 Days	68 Days	75 Days
Color	4°	9.0	8.0	n.a	6.9	6.8	n.a	n.a	6.2	n.a	n.a	n.a	4.3
	10°	9.0	7.7	n.a	6.7	6.1	6.3	n.a	5.3	5.9	5.7	3.3	n.a
	16°	9.0	6.1	6.4	5.8	5.2	n.a	4.9	n.a	3.2	n.a	n.a	n.a
Aspect	4°	9.0	7.2	n.a	6.0	7.3	n.a	n.a	6.1	n.a	n.a	n.a	4.4
	10°	9.0	7.2	n.a	6.6	5.9	5.7	n.a	5.6	5.1	5.3	4.3	n.a
	16°	9.0	5.8	5.7	5.6	5.3	n.a	4.6	n.a	4.7	n.a	n.a	n.a
Odor	4°	9.0	7.9	n.a	6.4	6.4	n.a	n.a	5.7	n.a	n.a	n.a	4.5
	10°	9.0	7.6	n.a	6.6	6.0	5.5	n.a	4.9	5.0	4.6	4.4	n.a
	16°	9.0	6.2	6.0	5.3	4.9	n.a	3.8	n.a	3.8	n.a	n.a	n.a
Taste	4°	9.0	7.7	n.a	6.3	6.7	n.a	n.a	5.6	n.a	n.a	n.a	4.3
	10°	9.0	7.3	n.a	6.1	n.a	6.2	n.a	5.2	n.a	6.4	n.a	n.a
	16°	9.0	6.3	6.4	5.3	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
General acceptance	4°	9.0	7.4	n.a	5.7	6.3	n.a	n.a	5.7	n.a	n.a	n.a	3.6
	10°	9.0	7.2	n.a	6.1	5.4	5.6	n.a	5.1	5.0	5.0	3.9	n.a
	16°	9.0	5.3	6.1	5.2	4.8	n.a	4.6	n.a	4.4	n.a	n.a	n.a

n.a: No sensory analysis was performed.

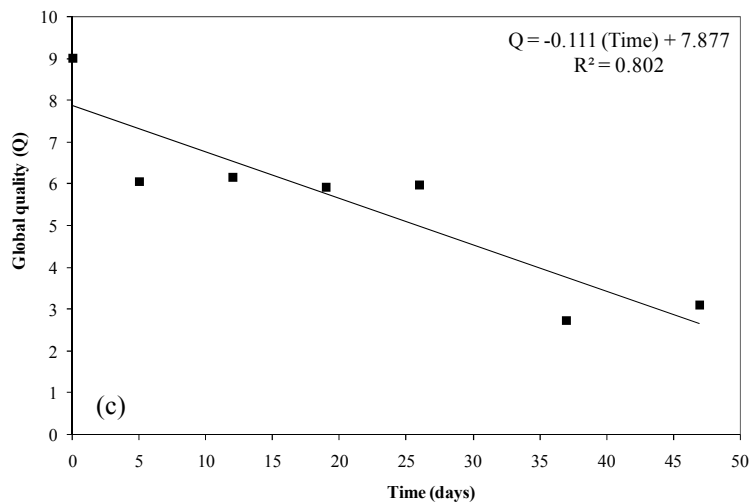
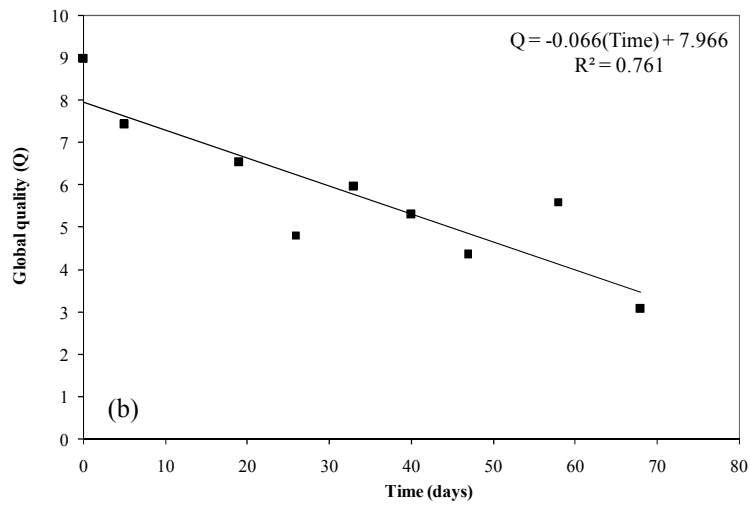
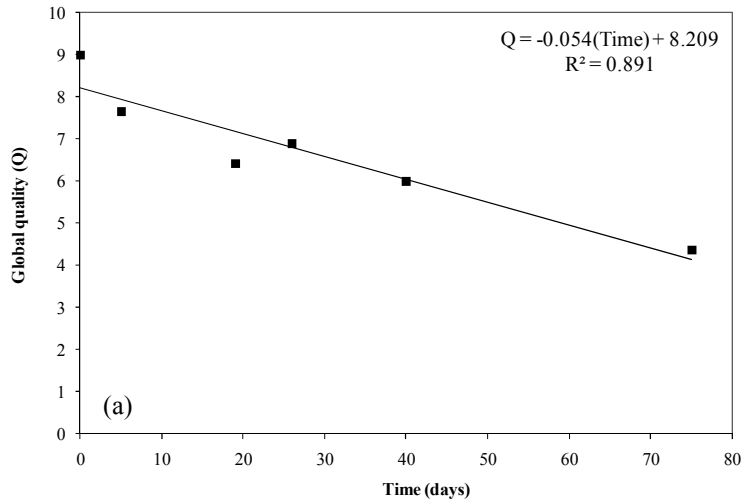


Figure 3. Linear regression of the sensorial global quality (Q) over time (days), at storage temperatures of 4°C (a), 10°C (b) and 16°C (c).

The shelf life of meat products has been generally defined by an undesirable alteration in appearance, texture and flavor, as well as by the maximum acceptable microbial counts, although high microbial counts may at some instances not cause noticeable spoilage (Borch et al., 1996). Sensory changes produced by lactic acid bacteria appear after the bacteria reach the stationary growth phase (Korkeala and Bjorkroth, 1997).

Korkeala et al. (1987) concluded that the probability that the count of $7 \log_{10}$ *Lactobacillus* spp./g cooked meat product would cause overt spoilage is about 10%. The time interval elapsed from the moment bacteria reached $7 \log_{10}$ CFU/g to the appearance of evident spoilage were 19 and 30 days at 4°C and 2°C, respectively. In the current study, the times elapsed between counts of $7 \log_{10}$ CFU/g and the established deterioration threshold were 35 and 21 days at 10°C and 16°C, respectively. At 4°C, maximum levels were always below $7 \log_{10}$ CFU/g, though sensory deterioration was observed after 59 days.

Rodríguez-Pérez et al. (2003) determined the shelf life of vacuum packed sliced cooked chicken breast based on sensory and microbial changes as a function of temperature (2.3, 6.5, 10, 13.5 and 17.7°C). At 13.5 and 17.7°C, the mean shelf life estimated microbiologically was shorter than that estimated by using sensory methods. This difference, which amounted to at least 8 days, was due to the so-called “delayed change”, reported in previous experiments with cooked meat products. In the present study, the delay in the sensory changes was observed for the three studied temperatures.

4. Conclusions

The Gompertz model is able to fit well the growth curves of *Lactobacillus plantarum* in vacuum-packaged cooked chopped pork under different storage temperatures (4, 10 and 16°C). The results allow for conclusion that LAB growth is strongly influenced by storage temperature, even under refrigeration conditions, and that abuse temperatures can cause a drastic reduction in product shelf life. Sensorial alteration appeared much later than the stationary phase was reached and it was not related to any concentration level.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the Capes Foundation (Brazil) for the

financial support of Francieli Dalcanton for her Ph.D. studies and both the Department of Food Science and Technology of the University of Córdoba (Córdoba, Spain) and the Junta de Andalucía/Project P08-CTS 3620, for the financial support to carry out this research.

References

Anzaldúa-Morales, A. 1994. La evolución sensorial de 10 alimentos en la teoría y la práctica. pp. 198, Acribia editor, Zaragoza, Spain.

AOAC- Association of Official Analytical Chemists International. 1995. Official methods of analysis 92.30, 16th edition, Gaithersburg, USA.

Baranyi, J., Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.

Borch, E., Kant-Muemansb, M.L., Blixt, Y. 1996. Bacterial spoilage of meat products and cured meat. *International Journal of Food Microbiology* 33, 103-120.

Bruna, J.M., Ordóñez, J.A., Fernández, M., Herranz, B., Hoz, L. 2001. Microbial and physico-chemical changes during the ripening of dry fermented sausages superficially inoculated with or having added an intracellular cell-free extract of *Penicillium aurantiogriseum*. *Meat Science* 59, 87-96.

Cayré, M.E., Vignolo, G., Garro, O. 2003. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsion stored at three temperatures. *Food Microbiology* 20, 561-566.

Cayré, M.E., Garro, O., Vignolo, G. 2005. Effect of storage temperature and gas permeability of packaging film on the growth of lactic acid bacteria and *Brochothrix thermosphacta* in cooked meat emulsions. *Food Microbiology* 22, 505-512.

Giannuzzi, L., Pinotti, A., Zaritzky, N. 1998. Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated beef at different temperature. *International Journal of Food Microbiology* 39, 101-110.

Gibson, A.M., Bratchell, N., Roberts, T.A. 1987. The effect of sodium chloride and temperature on rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *Journal of Applied Bacteriology* 62, 479-490.

Gray, J.I., Goma, E.A., Buckley, D.J. 1996. Oxidative Quality and Shelf Life of Meats. *Meat Science* 43, S111-123.

- Hugas, M., 1998. Bacteriocinogenic lactic bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science* 49, 139-150.
- Korkeala, H., Lindroth, S. Ahvenainen. R. Alanko, T. 1987. Interrelationship between microbial numbers and other parameters in the spoilage of vacuum-packed cooked ring sausage. *International Journal of Food Microbiology* 5, 311-321.
- Korkeala, H., Bjorkroth, K.J. 1997. Spoilage and contamination of vacuum-packaged cooked sausages: a review. *Journal of Food Protection* 60, 724–731.
- Koutsoumanis, K.P., Stamatiou, A.P., Drosinos, E.H., Nychas, G.J.E. 2008. Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. *Food Microbiology* 25, 915-921.
- Kreyenschmidt, J., Hubner, A., Beierle, E., Chonsch, L., Scherer, A., Petersen, B. 2010. Determination of the shelf life of sliced cooked ham based on the growth of lactic acid bacteria in different steps of the chain. *Journal of Applied Microbiology* 108, 510-520.
- Liu, F., Yang, R.Q., Li, Y.F. 2006 Correlations between growth parameters of spoilage micro-organisms and shelf-life of pork stored under air and modified atmosphere at -2, 4 and 10 °C. *Food Microbiology* 23, 578–583.
- Mataragas, M., Drosinos, E.H., Vaidanis, A., Metaxopoulos, I. 2006. Development of a Predictive Model for Spoilage of Cooked Cured Meat Products and Its Validation Under Constant and Dynamic Temperature Storage Conditions. *Journal of Food Science* 71, 157-167.
- McDonald, K., Sun, D.W. 1999. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 52, 1–27.
- Muermans, M.L.T., Stekelenburg, F.K., Zwietering, M.H., Huis in 't Veldt, J.H.J. 1993. Modelling of the microbiological quality of meat. *Food Control*, v. 4 n° 4, 216-221.
- Nakashima, S.M.K., André, C.D.S., Franco, B.D.G.M. 2000. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. *Brazilian Journal of Food Technology* 3, 41-51.
- Nychas, G.J.E., Skandamis, P.N., Tassou, C.C., Koutsoumanis, K.P. 2008. Meat spoilage during distribution. *Meat Science* 78, 77-89.
- Pexara, E.S., Metaxopoulos, J., Drosinos, E.H. 2002. Evaluation of shelf life of cured, cooked, sliced turkey fillets and cooked pork sausages - piroski - stored under vacuum and modified atmospheres at +4 and +10°C. *Meat Science* 62, 33-43.
- Rodríguez-Pérez, M.R., Zurera-Cosano, G., García-Gimeno, R.M., Barco-Alcalá, E., Castillejo-Rodríguez, A.M. 2003. Sensory and microbiological quality evaluation of

vaccum-packed sliced cooked chicken breast. Shelf-life estimation. *Journal of Food Quality* 26, 105-122.

Ruiz-Capillas, C., Carballo, J., Colmenero, F.J. 2007. Biogenic amines in pressurized vacuum-packaged cooked sliced ham under different chilled storage conditions. *Meat Science*, 75, 397-405.

Samelis, J., Kakouri, A., Rementzis, J. 2000. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *Food Microbiology* 17, 329-340.

Slongo, A.P., Rosenthal, A., Camargo, L.M.Q., Deliza, R., Mathias, S.P., Aragão, G.M.F. 2009. Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. *LWT- Food Science and Technology* 42, 303-306.

Stone, H., Sidel, J. 2004. *Sensory evaluation practices*. Elsevier Academic Press. Third edition. California, USA.

Sutherland, J.P., Bayliss, A.J., Roberts, T.A. 1994. Predictive modeling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology* 21(3), 217-236.

UNE-EN ISO 6579. 2002. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). Madrid, Spain.

UNE-EN ISO 11290-2. 2000. Método horizontal para la detección y recuento de *Listeria monocytogenes*. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). Madrid, Spain.

UNE ISO 87-004-79. 1997. Análisis sensorial. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). Madrid, Spain.

Witting de Penna, Q. 1981. Evaluación sensorial, una metódica que mide calidad. II. Evaluación de Calidad mediante el Test de Valoración con Escala de Karlsruhe. *Alimentos* 6, 25-31.

Zurera-Cosano, G., García-Gimeno, R.M., Rodríguez-Pérez, R., Hervás-Martínez C. 2006. Performance of response surface model for prediction of *Leuconostoc mesenteroides* growth parameters under different experimental conditions. *Food Control* 17, 429-438.

4.4.2 Informações complementares

A Figura 4.12 apresenta a influência da temperatura (4, 10 e 16°C) nos parâmetros de crescimento de *L. plantarum* em *chopped* suíno embalado a vácuo, além das equações obtidas pelos modelos secundários e seus respectivos coeficientes de correlação. Os modelos secundários aplicados foram os que apresentaram melhores ajustes para descrever o efeito da temperatura sobre os parâmetros de crescimento de *L. plantarum* em meio MRS, apresentando bons ajustes também no produto cárneo. Como pode ser observado na Figura 4.12, a influência da temperatura sobre a fase lag (λ) foi bem descrita pela equação exponencial ($R^2 = 0,992$), sobre a velocidade de crescimento (μ) foi descrita pelo modelo da raiz quadrada ($R^2 = 0,970$) e sobre a densidade populacional máxima (MPD) foi bem descrita pela equação do tipo Arrhenius ($R^2 = 0,996$). Apesar dos modelos terem sido estabelecidos com três temperaturas, estes apresentaram de forma coerente a tendência dos parâmetros de crescimento no intervalo de 4°C a 16°C. Por isto, através das equações obtidas para cada parâmetro, é possível prever o comportamento desta bactéria no *chopped*, de modo que se torna uma ferramenta útil para as indústrias de alimentos, podendo prever o comportamento desta BAL, que é uma das principais bactérias encontrada nos produtos cárneos, determinando desta maneira a vida de prateleira destes produtos.

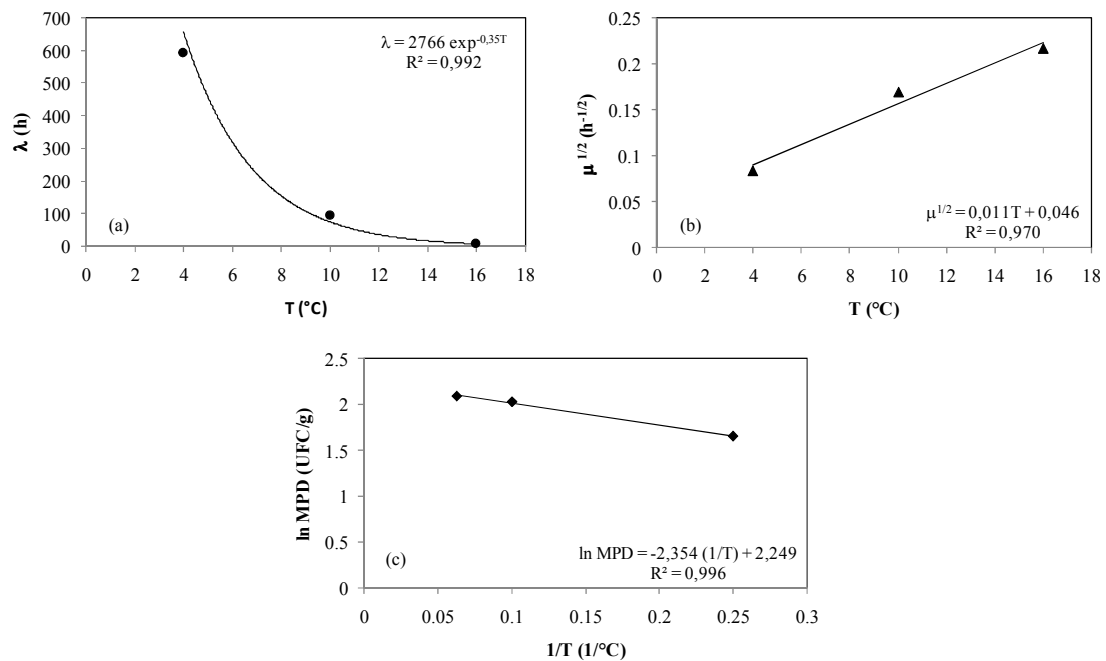


Figura 4.12. Efeito da temperatura nos parâmetros de crescimento de *Lactobacillus plantarum* em *chopped*. (a): λ - equação exponencial; (b): μ - modelo da raiz quadrada; (c): MPD - equação do tipo Arrhenius. As linhas representam os ajustes dos modelos secundários aos parâmetros de crescimento (símbolos).

Um estudo prévio foi realizado analisando a microbiota do *chopped* sob condições de aerobiose e anaerobiose, armazenado em diferentes temperaturas (4, 10 e 16 $^{\circ}\text{C}$). Foram acompanhados os dados de crescimento de BAL e de contagem total. As análises foram realizadas em triplicata e uma grande variabilidade foi encontrada entre as amostras, sendo que as curvas apresentadas na Figura 4.13 representam a maior contagem obtida entre as três fatias. Devido a esta grande variabilidade, não foi possível modelar o crescimento das BAL, por isto, optou-se por inocular *L. plantarum* no produto. O acompanhamento do pH foi realizado nas amostras de *chopped* (Figura 4.14), sendo que o mesmo se manteve praticamente constante ao longo do tempo analisado. Apesar das análises microbiológicas apresentarem grande variabilidade nas triplicatas analisadas, os valores de pH apresentaram pequenos desvios entre as amostras.

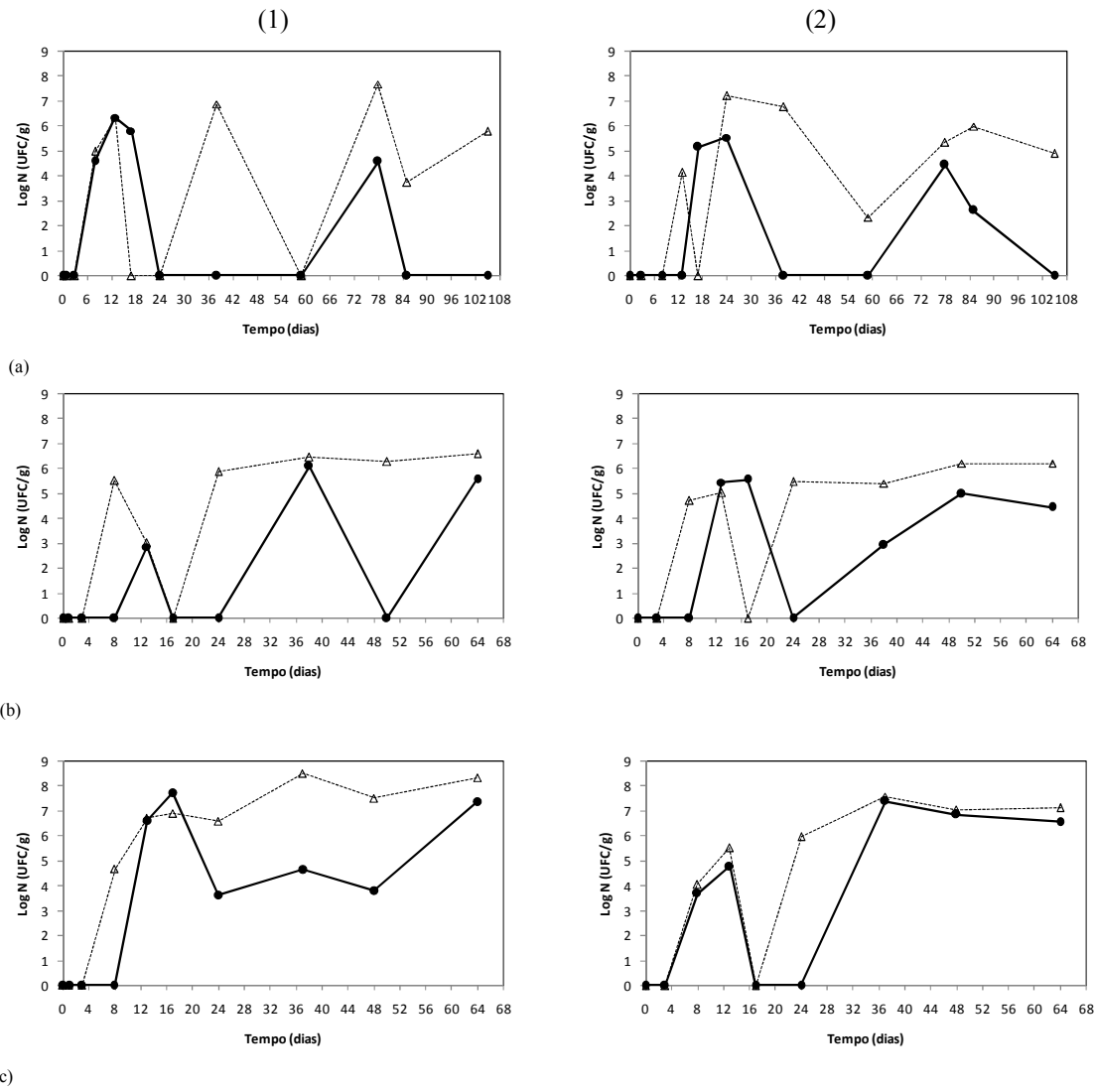


Figura 4.13: Exemplo dos dados de crescimento de BAL (—●—) e contagem total (-Δ-) em *chopped*, armazenado em condições de aerobiose (coluna 1) e a vácuo (coluna 2), nas temperaturas de 4°C (a), 10°C (b) e 16°C (c).

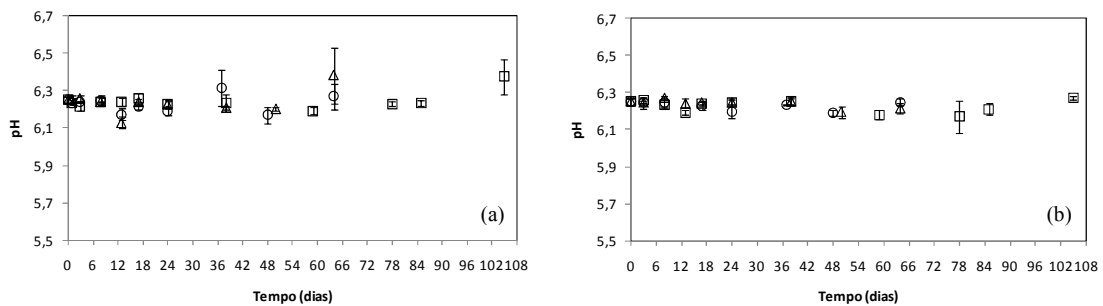


Figura 4.14. Valores de pH para as amostras de *chopped* embalado em aerobiose (a) e a vácuo (b) nas temperaturas de 4°C (□), 10°C (Δ) e 16°C (○). As barras representam o desvio padrão.

A Figura 4.15 apresenta um exemplo do estudo da predição do crescimento de *L. plantarum* em *chopped* sob condições não isotérmicas, além das curvas isotérmicas para efeitos de comparação. A simulação foi realizada utilizando-se o modelo de crescimento não-isotérmico (Equação 3, item 4.2.1). As curvas de crescimento foram obtidas graficando-se $\text{Log}(N/N_0)$ (UFC/g) vs tempo (h), onde N_0 corresponde a $3,77 \log_{10}$ UFC/g. O perfil proposto variou de 4°C a 10°C a cada 12h, até a bactéria atingir a fase estacionária. Pode-se observar que a variação da temperatura provoca um crescimento acelerado do micro-organismo no produto, atingindo aproximadamente $7 \log_{10}$ UFC/g em 450 h de armazenamento, tempo este que o produto mantido na menor temperatura isotérmica (4°C) ainda não apresentou crescimento do micro-organismo (fase lag). Esta simulação pode ser utilizada para prever os experimentos em condições não-isotérmicas que poderiam ser realizados futuramente para validação do modelo do crescimento de *L. plantarum* em produto cárneo, sob condição de temperatura variável.

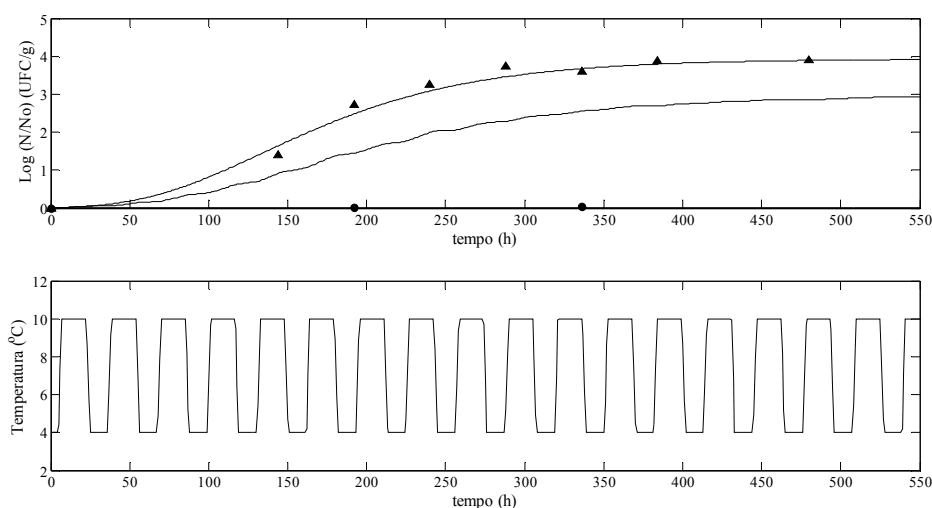


Figura 4.15. Predição da curva de crescimento de *Lactobacillus plantarum* inoculado em *chopped* sob condições não isotérmicas. *Top*: ajustes das curvas de crescimento sob condições isotérmicas a 4°C (●) e 10°C (▲), e a curva predita pelo modelo não isotérmico. *Bottom*: perfil de temperatura 4 - 10°C .

4.4.3 Nomenclatura

BAL ou LAB	Bactérias ácido lácticas
UFC ou CFU	Unidades formadoras de colônias
MRS	Meio de cultivo (Man, Rogosa e Sharpe)
T	Temperatura (°C)
T	Tempo (horas ou dias)
λ	Duração da fase lag (h)
μ	Velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})
MPD	Densidade populacional máxima (CFU/g)
PCA	<i>Ágar plate count</i>
Q	Qualidade global
Log N	Logaritmo decimal da contagem microbiana no tempo t (CFU/g)
N_0	Contagem microbiana inicial (CFU/g)
A	Aumento logarítmico da população
B	Velocidade de crescimento relativa no tempo M (h^{-1})
M	Tempo para atingir a velocidade máxima de crescimento (h)
R	Coefficiente de correlação de Pearson
R^2	Coefficiente de correlação
N	Número de pontos experimentais
P	Número de parâmetros do modelo
MSE	Erro médio quadrático
S	Segundos

4.5 Avaliação da capacidade preditiva dos modelos secundários.

A última etapa na avaliação de um modelo consiste em determinar se o mesmo tem habilidade de prever respostas de novas situações (McMEEKIN et al., 2008). A avaliação das capacidades preditivas dos modelos secundários estabelecidos para os parâmetros de crescimento de culturas de *L. plantarum*, *L. viridescens* e *L. sakei* cultivadas em meio MRS, em diferentes temperaturas, bem como do modelo estabelecido para a velocidade de crescimento de *L. plantarum* cultivada em meio MRS sob diferentes condições (temperatura, pH, NaCl e Na-lactato) foram realizadas. Os modelos foram obtidos de dados gerados a partir de medidas de absorvância e foram comparados com os parâmetros de crescimento de uma cultura de *L. plantarum* inoculada no *chopped* e com dados da literatura sobre o crescimento de BAL em produtos cárneos.

A Figura 4.16 apresenta os modelos secundários (equação da potência) que descrevem a influência da temperatura sobre a fase lag de *L. plantarum*, *L. viridescens* e *L. sakei*, cultivadas em meio MRS. Estes modelos foram comparados com dados da literatura relativos ao crescimento de BAL em carne bovina embalada em filme de polietileno (GIANNUZZI et al., 1998), em presunto cozido embalado a vácuo (RODRÍGUEZ-PÉREZ, 2004) e em peito de frango embalado em atmosfera modificada (MEZARROBA, 2010).

Como pode ser observado na Figura 4.16, os modelos para *L. viridescens* e *L. sakei* apresentam capacidades de ajuste similares, sendo que, no modelo de *L. plantarum* as predições para a fase lag foram menores. Os modelos estabelecidos em meio MRS puderam estimar bem a fase lag de BAL no presunto, mesmo que o modelo tenha sido estabelecido a partir de culturas puras, em meio de cultivo. Quando a comparação é realizada com a fase lag de BAL em carne bovina, percebe-se que o modelo de *L. plantarum* apresenta melhor predição, para quase todas as temperaturas testadas. As bactérias ácido lácticas presentes no peito de frango armazenado a 20°C não apresentaram fase lag, havendo uma diferença de aproximadamente 5 h em relação às curvas preditas. Com relação aos dados da fase lag obtidos na avaliação do crescimento do *chopped* (item 4.4.1 deste trabalho), estes não foram graficados, pois são maiores que os observados no meio de cultivo a 4°C e 10°C, ou seja, 25 dias e 4 dias, respectivamente. Quando a temperatura de armazenamento foi de 16°C, a bactéria não

apresentou fase lag, sendo que a predição dos modelos é de aproximadamente 10 h, nesta temperatura.

Sabe-se que o crescimento de um determinado micro-organismo em um alimento depende de várias características, como a disponibilidade de nutrientes, pH, atividade de água, presença de conservantes, atmosfera da embalagem, temperatura, competição e/ou interação com outros micro-organismos, tamanho do inóculo ou concentração inicial, entre outras. Por isto, a duração da fase de adaptação é de difícil predição, pois depende de todos estes fatores (BUCHANAN e KLAWITTER, 1991; BARANYI e ROBERTS, 1994).

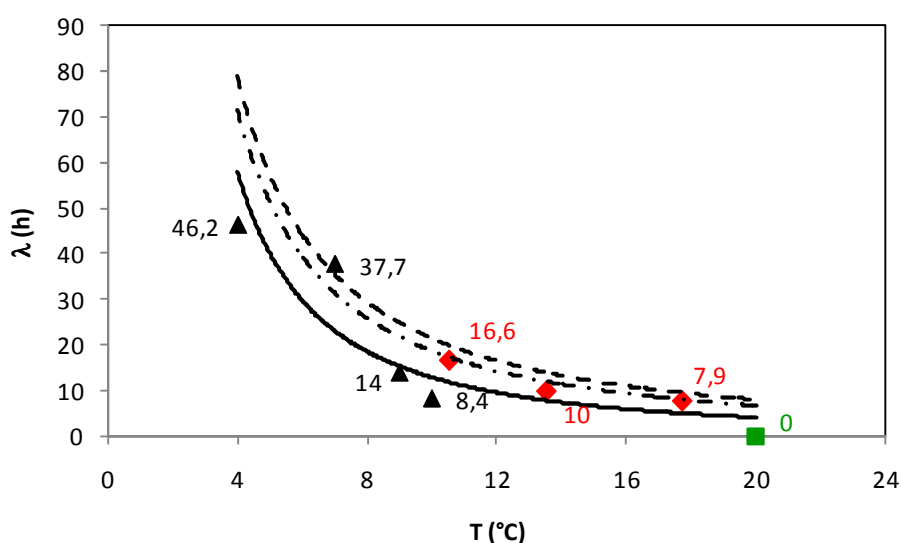


Figura 4.16. Comparação entre os modelos preditos para a fase lag (λ) de *L. plantarum* (—), *L. viridescens* (·-·-·) e *L. sakei* (-·-·-) cultivadas em meio MRS e a fase lag de BAL observada em diferentes produtos cárneos: BAL em carne bovina embalada em filme de polietileno (▲), BAL em presunto cozido embalado a vácuo (◆) e BAL em peito de frango embalado em atmosfera modificada (■).

A Figura 4.17 apresenta os modelos estabelecidos para a velocidade de crescimento de *L. plantarum*, *L. viridescens* e *L. sakei* em meio MRS, no intervalo de temperatura de 4°C a 20°C (modelo da raiz quadrada), assim como o modelo de superfície de resposta (apresentado no item 4.3.1). Como este modelo apresenta quatro variáveis, para esta comparação, foram considerados os valores de temperaturas variando entre 4°C a 16°C, e os valores de pH, NaCl e Na-lactato foram fixados em 6,2, 3% e 0%, respectivamente. Estes valores foram fixados em função da composição

aproximada encontrada no *chopped*. Nesta figura, os modelos são comparados com cinco produtos cárneos: presunto, carne bovina e peito de frango (referências apresentadas para a fase lag), salsicha embalada a vácuo (CAYRÉ et al., 2003), além dos dados obtidos na avaliação do crescimento do *chopped*. Apesar do modelo da superfície de resposta prever valores mais baixos da velocidade de crescimento nas menores temperaturas, em geral, este modelo e os modelos de *L. plantarum* e *L. viridescens* preveem bem as velocidades de crescimento, levando-se em conta que somente no *chopped* a bactéria foi inoculada, e nos outros produtos é a microbiota de BAL. Somente o modelo de *L. sakei* apresentou menores previsões no intervalo de temperatura analisado. Sarmiento (2006) também observou que *L. sakei* apresentou menores velocidades de crescimento quando comparadas com *L. plantarum* cultivadas na temperatura ótima de crescimento.

Como mencionado anteriormente (item 4.1), a velocidade de crescimento de *L. plantarum* foi similar em tamanhos de inóculos diferentes, quando o cultivo foi realizado a 30°C em meio MRS. Os produtos avaliados apresentam diferentes contagens iniciais, como por exemplo, 10² UFC/cm² em carne bovina, 10⁵ UFC/g em presunto e 10³ UFC/g em salsicha, sendo que os modelos da raiz quadrada foram construídos a partir de um inóculo inicial de 10⁶ - 10⁷ UFC/mL e o modelo de superfície de resposta em aproximadamente 10³ UFC/mL. Levando-se em conta estas informações, e sabendo que cada produto cárneo apresenta características específicas, como conservantes, nutrientes disponíveis e atmosfera que os envolve, pode-se dizer que os modelos propostos servem como base para o conhecimento da velocidade de crescimento de BAL em produtos cárneos.

A Figura 4.18 apresenta a comparação dos modelos estabelecidos para descrever a influência da temperatura sobre o aumento logarítmico da população (equação do tipo Arrhenius) das três BAL cultivadas em meio MRS, e o aumento da população de BAL na carne bovina, presunto, peito de frango e *chopped*. Analisando-se a figura, pode-se perceber que os três modelos apresentam ajustes similares, e que as maiores diferenças foram encontradas para o peito de frango armazenado a 20°C e para o *chopped* armazenado a 16°C.

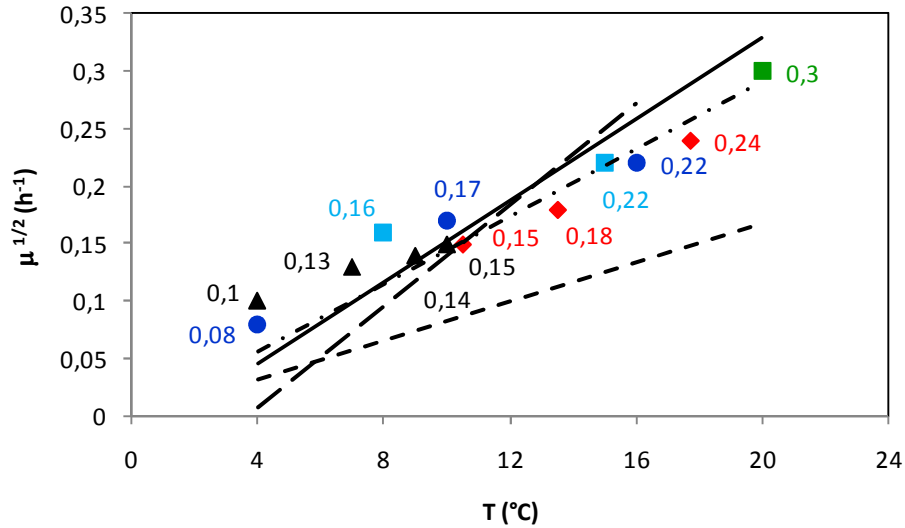


Figura 4.17. Comparação entre os modelos preditos para a velocidade de crescimento (μ) de *L. plantarum* (—), *L. viridescens* (----) e *L. sakei* (----) cultivadas em meio MRS, e *L. plantarum* (—) cultivada em meio MRS modificado* e a velocidade de crescimento observada em diferentes produtos cárneos: BAL em carne bovina (▲), BAL em presunto cozido (◆), BAL em peito de frango (■), *L. plantarum* inoculado em *chopped* (●) e BAL em salsicha (■).

*condições do meio fixadas: pH= 6,2, NaCl= 3% e Na-lactato = 0%.

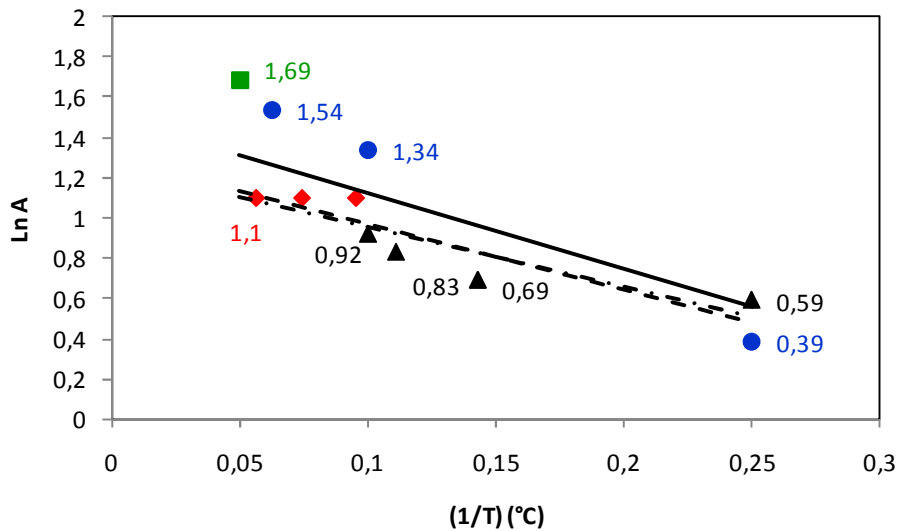


Figura 4.18. Comparação dos modelos preditos para o aumento logarítmico da população (A) de *L. plantarum* (—), *L. viridescens* (----) e *L. sakei* (----) cultivadas em meio MRS e o aumento logarítmico da população observado em diferentes produtos cárneos: BAL em carne bovina embalada em filme de polietileno (▲), BAL em presunto cozido embalado a vácuo (◆), BAL em peito de frango embalado em atmosfera modificada (■) e *L. plantarum* inoculado em *chopped* embalado a vácuo (●).

Para melhor comparação entre os valores preditos e observados, a Figura 4.19 apresenta curvas de crescimento obtidas pelo modelo de Gompertz modificado, utilizando-se os parâmetros de crescimento preditos pelos modelos secundários estabelecidos para o crescimento de *L. plantarum*, *L. viridescens* e *L. sakei*, cultivadas em meio MRS, e dos parâmetros apresentados na literatura para vários produtos armazenados à temperatura de 10°C. São apresentadas as curvas de crescimento para *L. plantarum* inoculada no *chopped* embalado a vácuo, além das BAL em presunto cozido embalado a vácuo e na carne bovina embalada em filme de polietileno.

A Figura 4.19 mostra que o comportamento de *L. plantarum* em meio MRS foi semelhante ao da BAL em presunto, enquanto o comportamento de *L. viridescens* foi semelhante ao observado na carne bovina, sendo que a diferença observada entre estas curvas foi de aproximadamente meio ciclo logarítmico. Entretanto, considerando a contagem bacteriana final, esta diferença pode ser considerada pequena. Como esperado pelos dados citados acima, a curva que apresentou maior diferença, foi no *chopped*, que apresentou uma grande fase lag, apesar das velocidades de crescimento serem próximas, e a população máxima atingida ser aproximadamente um ciclo logarítmico superior quando comparada ao crescimento de *L. plantarum* cultivada no meio MRS. O comportamento de *L. sakei* é distinto tanto das outras bactérias cultivadas em MRS, quanto das bactérias presentes nos produtos cárneos. Esta cultura apresenta os parâmetros fase lag e a população máxima próximos aos observados por *L. viridescens*, porém, como visto anteriormente, a cultura de *L. sakei* apresenta uma menor velocidade de crescimento quando comparada com todos os produtos cárneos apresentados neste estudo.

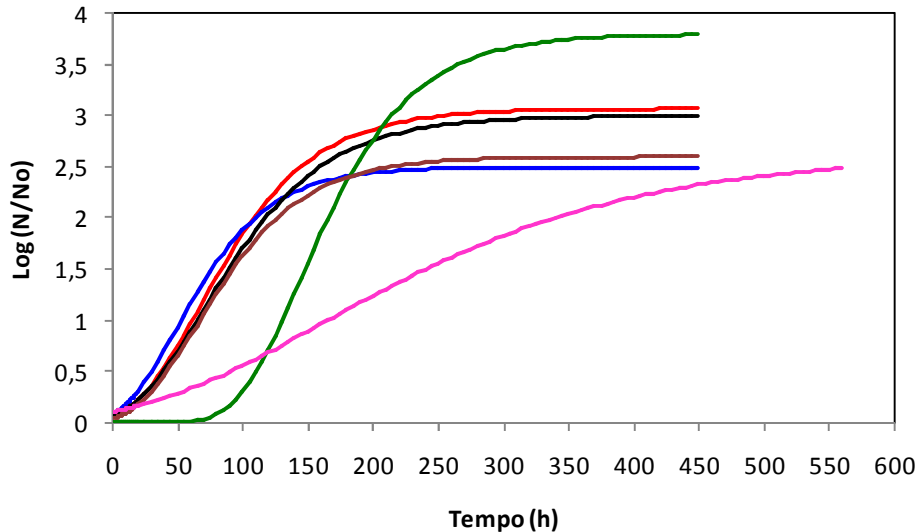


Figura 4.19 Comparação das curvas de crescimento construídas a partir do modelo de Gompertz modificado utilizando-se os parâmetros de crescimento obtidos a 10°C para *L. plantarum* em meio MRS (abs) (—), *L. viridescens* em meio MRS (abs) (—), *L. sakei* em meio MRS (abs) (—), BAL em presunto cozido embalado a vácuo (UFC/g) (—), BAL em carne bovina embalada em filme de polietileno (UFC/cm²) (—) e *L. plantarum* inoculada em *chopped* embalado a vácuo (UFC/g) (—).

A avaliação da capacidade de predição dos modelos secundários de *L. plantarum* cultivada em meio MRS também foram avaliados por índices estatísticos adequados, como o fator bias (B_f) e fator exatidão (A_f). Como o comportamento de *L. viridescens* foi similar ao de *L. plantarum*, e que *L. sakei* apresenta valores distintos da velocidade de crescimento, as análises foram realizadas somente para os modelos secundários de *L. plantarum*.

Para o cálculo da capacidade preditiva do modelo secundário estabelecido para a fase lag, foram considerados os dados de três produtos cárneos, presunto, carne bovina e peito de frango, resultando em $B_f = 1,05$ e $A_f = 1,27$. Não foram usados para estes cálculos os dados da fase lag no *chopped*, pois apresentam valores muito maiores a 4°C e 10°C, e na salsicha (dados não apresentados na referência). Para a velocidade de crescimento foram considerados os dados do presunto, salsicha, *chopped*, peito de frango e carne bovina (exceto a 4°C), obtendo-se os valores de $B_f = 0,90$ e $A_f = 1,38$. Para o aumento logarítmico da população foram considerados todos os produtos cárneos resultando em $B_f = 0,95$ e $A_f = 1,27$.

Lebert et al. (2000) validaram os modelos preditivos para descrever os parâmetros de crescimento de *L. monocytogenes* com dados da literatura de produtos

lácteos, cárneos e vegetais. Os valores de B_f variaram de 0,61 a 1,10 e de A_f de 1,22 a 1,67. Em outro estudo, Barco (2001) obteve valores de $B_f = 0,71$ e $A_f = 1,65$ para a estimativa da velocidade de crescimento de *E. coli* em produtos cárneos por um modelo de regressão. Os valores de B_f obtidos neste estudo, para os três parâmetros de crescimento, variaram de 0,90 a 1,05, e os valores de A_f variaram de 1,27 a 1,38. Estes valores mostram que os modelos apresentam uma boa capacidade preditiva para os três parâmetros de crescimento.

Vários autores discutem as dificuldades e limitações encontradas em empregar dados de crescimento obtidos da literatura para validar um modelo preditivo (SUTHERLAND et al., 1994; NEUMEYER et al., 1997; RODRÍGUEZ-PÉREZ, 2004). Com base nas respostas obtidas pela comparação dos modelos estabelecidos em meio de cultivo para o crescimento das BAL e das características específicas de cada produto cárneo, é possível dizer que os modelos apresentados neste trabalho servem como uma boa base para se prever o comportamento global das BAL em produtos cárneos.

Os resultados apresentados mostram que os modelos desenvolvidos a partir do crescimento das culturas BAL em MRS, usando medidas de absorvância, puderam prever adequadamente o crescimento desse grupo de micro-organismos em produtos cárneos de diferentes composições. Isso é um indicativo de que, para os produtos e meio de cultura investigados, o crescimento da BAL depende muito mais da temperatura do que da composição do meio. Esses resultados permitem o uso de dados de crescimento das BAL em meio MRS para se investigar a influência de variáveis ambientais no crescimento desse grupo de micro-organismos, que é um procedimento experimental muito mais simples, rápido e barato do que a técnica de culturas em placas de Petri. Esse procedimento poderia ser aplicado, por exemplo, no desenvolvimento de novas formulações de produtos cárneos e na avaliação das mudanças de composição no desenvolvimento deste grupo de micro-organismos, que se constitui no principal grupo de bactérias deteriorantes dessa classe de alimentos. Feito isso, pode-se formular modelos preditivos a partir de dados de crescimento das BAL e de outros micro-organismos unicamente no produto formulado com base nas informações obtidas em meio MRS. Com esse procedimento, o tempo e os custos envolvidos serão muito menores. Uma outra aplicação direta dos resultados obtidos é o estudo do impacto de abusos de temperatura no armazenamento desses produtos, pois o comportamento geral das BAL em meio MRS representa adequadamente o que ocorre em produtos cárneos.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

Através deste estudo, que teve como objetivo geral modelar o crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isotérmicas e não isotérmicas, foi possível tirar as seguintes conclusões:

- O modelo primário de Gompertz foi o escolhido para descrever as curvas de crescimento de *L. plantarum*, *L. viridescens* e *L. sakei* em diferentes condições isotérmicas (4 a 30°C);
- A influência da temperatura na duração da fase lag foi melhor descrita pela equação da potência. Para a velocidade de crescimento, o modelo da raiz quadrada foi o que melhor descreveu esta influência, e para o aumento logarítmico da população foi a equação do tipo Arrhenius;
- A partir do estudo dos modelos primários e secundários pode-se concluir que o crescimento das BAL é fortemente influenciado pela temperatura de armazenamento, mesmo sob condições de refrigeração;
- Foi possível estabelecer um modelo de crescimento não isotérmico para *L. plantarum* e validá-lo com diferentes perfis de temperatura (4-12°C, 5-15°C e 20-30°C). Para uma melhor descrição da fase estacionária da curva de crescimento, foi considerado o cálculo do parâmetro A_{efetivo} ;
- Um modelo de superfície de resposta foi estabelecido para a velocidade de crescimento de *L. plantarum*. A temperatura foi a variável que teve maior influência sobre este parâmetro, seguida pela concentração de NaCl, Na-lactato e pH. O modelo proposto foi validado com condições experimentais adicionais realizadas dentro do domínio do delineamento experimental;
- O modelo primário de Gompertz apresentou bom ajuste às curvas de crescimento de *L. plantarum* no *chopped* suíno cozido embalado a vácuo e armazenado em diferentes temperaturas (4°C, 10°C e 16°C);
- As equações dos modelos secundários, que descrevem a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento de *L. plantarum* no produto cárneo, foram às mesmas que apresentaram os melhores ajustes quando esta bactéria cresceu em meio de cultivo MRS;

- O crescimento de *L. plantarum* no produto cárneo foi fortemente influenciado pelas temperaturas de armazenamento, mesmo sob temperaturas de refrigeração, e o abuso de temperatura causou uma drástica redução na vida de prateleira do produto;
- As alterações sensoriais no *chopped* foram observadas vários dias depois da BAL atingir a fase estacionária. Por isto, não foi possível encontrar uma relação entre o nível de concentração de *L. plantarum* e a vida de prateleira definida pela análise sensorial;
- Os resultados apresentados mostram que os modelos desenvolvidos a partir do crescimento das culturas das BAL em meio MRS, usando medidas de absorbância, puderam prever adequadamente o crescimento desse grupo de micro-organismos em produtos cárneos de diferentes composições.

Com base no acima exposto, pode-se afirmar que uma grande contribuição dos modelos propostos no presente trabalho, obtidos de culturas puras de BAL cultivadas em meio MRS, está na aplicação destes, por exemplo, no desenvolvimento de novas formulações de produtos cárneos, podendo, desta forma, servir como base no estudo do comportamento da microbiota das BAL, que são as principais bactérias responsáveis pela deterioração de produtos cárneos.

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- A partir do modelo de crescimento não isotérmico estabelecido para *L. plantarum*, simular diferentes perfis de temperatura e validar estas simulações em produto cárneo;
- Estabelecer os modelos não isotérmicos para *L. viridescens* e *L. sakei*, com base nos dados obtidos em condições isotérmicas neste estudo, comparar as simulações para as três bactérias e validar os modelos propostos com produtos cárneos armazenados sob condições de flutuação de temperatura;
- Realizar cultivos com cultura mista das BAL, analisar o seu comportamento e comparar com os dados obtidos neste trabalho em cultura pura;
- Realizar cultivos em caldo de produto cárneo e comparar os dados de crescimento obtidos com meio MRS e com outros produtos cárneos.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS

AMMOR, S., TAUVERON, G., DUFOUR, E., CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. Screening and characterization of the antibacterial compounds. **Food Control**, v.17, p.454-461, 2006.

ANTWI, M.; THEYS, T.E.; BERNAERTS, K.; VAN IMPE, J.F.; GEERAERD, A.H. Validation of a model for growth of *Lactococcus lactis* and *Listeria innocua* in a structured gel system: Effect of monopotassium phosphate. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p.320–329, 2008.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em 18 de setembro de 2010.

ANZALDUA-MORALES, A. **La evolution sensorial de 10 alimentos en la teoría y la práctica**. Editora Acribia, Zaragoza, Espanha, 1994.

AUGUSTIN, J.C., BROUILLAUD-DALETTRE, A., ROSSO, L., CARLIE, V. Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.1706-1710, 2000.

AUGUSTIN, J.C., ROSSO, L., CARLIER, V. Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. **Journal of Microbiological Methods**, v.38, p.137–146, 1999.

AOAC- Association of Official Analytical Chemists International. **Official methods of analysis 992.30**, 16th edition, Gaithersburg, USA, 1995.

BAHADORI, A., VUTHALURU, H.B. Simple Arrhenius-type function accurately predicts dissolved oxygen saturation concentrations in aquatic systems. **Process Safety and Environmental Protection**, v.88, p.335–340, 2010.

BARANYI, J., ROBERTS, T.A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.277-294, 1994.

BARCO, E. **Elaboración de modelos predictivos de crecimiento microbiano para *Escherichia coli* O157:H7. Validación en productos cárnicos cocidos envasados al vacío.** Tese de Doutorado, Universidade de Córdoba (UCO), Córdoba, Espanha, 2001.

BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos.** Segunda edição. Editora Unicamp. Campinas, SP, Brasil, 1995.

BORCH, E., KANT-MUEMANSB, M.L., BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat products and cured meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.33, p.103-120, 1996.

BRASIL. Portaria nº1004, de 11 de dezembro de 1998. Regulamento técnico de atribuição de função de aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria de carnes e produtos cárneos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 de março, 1999.

BREWER, M.S., MCKEITH, F., MARTIN, S.E., DALLMIER, A.W., MEUER, J. Sodium lactate effects on shelf life, sensory and physical characteristics of fresh pork sausage. **Journal of Food Science**, v.56, n.5, p.1176-1178, 1991.

BRUL, S.; MENSONIDES, F.I.C.; HELLINGWERF, K.J.; MATTOS, M.J.T. Microbial systems biology: New frontiers open to predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, p.16-21, 2008.

BRUNA, J.M., ORDÓÑEZ, J.A., FERNÁNDEZ, M., HERRANZ, B., HOZ, L. Microbial and physico-chemical changes during the ripening of dry fermented sausages superficially inoculated with or having added an intracellular cell-free extract of *Penicillium aurantiogriseum*. **Meat Science**, v.59, p.87-96, 2001.

BUCHANAN, R.L., WHITING, R.C., DAMERT, W.C. When is simple good enough: A comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. **Food Microbiology**, v.14, p.313-326, 1997.

BUCHANAN, R. L. Developing and distributing user-friendly application software. **Journal of Industrial Microbiology**, v.12, p.251-255, 1993.

BUCHANAN, R.L., KLAWITTER, L.A. Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v.12, p.235-246, 1991.

CARRASCO, E., GARCÍA-GIMENO, R., SESELOVSKY, R., VALERO, A., PÉREZ, F., ZURERA-COSANO, G., TODD, E. Predictive model of *Listeria monocytogenes* growth rate under different temperatures and acids. **Food Science and Technology International**, v.12, p.47-56, 2006.

CAYRÉ, M.E.; VIGNOLO, G.; GARRO, O. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsion stored at three temperatures. **Food Microbiology**, v.20, p.561-566, 2003.

CAYRÉ, M.E., VIGNOLO, G., GARRO, O. Modelo dinámico para el crecimiento de bacterias lácticas sobre emulsiones cárnicas. **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**. Resumen: E-072, Universidad Nacional del Nordeste, 2004.

CAYRÉ, M.E., GARRO, O., VIGNOLO, G. Effect of storage temperature and gas permeability of packaging film on the growth of lactic acid bacteria and *Brochothrix thermosphacta* in cooked meat emulsions. **Food Microbiology**, v.22, p.505-512, 2005.

CHANDLER, R.E., McMEEKIN T.A. Temperature function integration and its relationship to the spoilage of pasteurized, homogenized milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.40, p.37-41, 1985.

CHOWDHURY, B.R., CHAKRABORTY, R., CHAUDHURI, U.R. Validity of modified Gompertz and Logistic models in predicting cell growth of *Pediococcus acidilactici* H during the production of bacteriocin pediocin AcH. **Journal of Food Engineering**, v.80(4), p.1171-1175, 2007.

COOPER, K.E. The theory of antibiotic inhibition zones. In **Analytical microbiology**, F. Kavanagh (Ed.), Academic Press, New York, 1963.

CORRADINI, M.G., AMÉZQUITA, A., NORMAND, M.D., PELEG, M. Modeling and predicting non-isothermal microbial growth using general purpose software. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.223-228, 2006.

CORRADINI, M.G., PELEG, M. Estimating non-isothermal bacterial growth in foods from isothermal experiments data. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.187-200, 2005.

DALGAARD, P., KOUTSOUMANIS, K. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. **Journal of Microbiological Methods**, v.43, p.183-196, 2001.

DALGAARD, P.; MEJLHOLM, O.; HUSS, H. H. Application of an iterative approach for development of a microbial model predicting the shelf life of packed fish. **International Journal of Food Microbiology**, v.38, p.169-179, 1997.

DAVEY, K.R., DAUGHTRY, B.J. Validation of a model for predicting the combined effect of three environmental factors on both exponential and lag phases of bacterial growth: temperature, salt concentration and pH. **Food Research International**, v.28, n.3, p.233-237, 1995.

DEVLIEGHERE, F., GEERAERD, A.H., VERSYCK, K.J., BERNAERT, H., VAN IMPE, J.F., DEBEVERE, J. Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of Na-lactate as a fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. **International Journal of Food Microbiology**, v.58, p.93–106, 2000.

DEVLIEGHERE, F., VAN BELLE, B., DEBEVERE, J. Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. **International Journal of Food Microbiology**, v.46, p.57-70, 1999.

DEVLIEGHERE, F., DEBEVERE, J., VAN IMPE, J.F. Effect of dissolved carbon dioxide and temperature on the growth of *Lactobacillus sake* in modified atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, p.231–238, 1998.

DROSINOS, E.H., MATARAGAS, M., KAMPANI, A., KRITIKOS, D., METAXOPOULOS, I. Inhibitory Effect of Organic Acid Salts on Spoilage Flora in Culture Medium and Cured Cooked Meat Products Under Commercial Manufacturing Conditions. **Meat Science**, v.73, p.75-81, 2006.

ERKMEN, O; ALBEN, E. Mathematical modeling of citric acid production and biomass formation by *Aspergillus niger* in undersized semolina. **Journal of Food Engeneering**, v.52, p.161-166, 2002.

FARAG, H.E.M., KORASHY N.T. Lactic Acid and pH as Indication for Bacterial Spoilage of Meat and Some Meat Products. **Journal of Applied Sciences Research**, v.2(8), p.522-528, 2006.

FRANCO, B.G.M.F.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. Editora Atheneu, São Paulo, SP, Brasil, 1996.

FRANZ, C.M.A.P., VON HOLY, A. Thermotolerance of meat spoilage lactic acid bacteria and their inactivation in vacuum-packaged vienna sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, p.59-73, 1996.

FUJIKAWA, H., KAI, A., MOROZUMI, S., A new logistic model for *Escherichia coli* growth at constant and dynamic temperatures. **Food Microbiology**, v.21, p.501-509, 2004.

GARCÍA-GIMENO, R.M., CASTILLEJO- RODRÍGUEZ, A.M., BARCO- ALCALÁ, E., ZURERA- COSANO, G. Determination of packaged green asparagus shelf-life. **Food Microbiology**, v.15, p.191-198, 1998.

GARCÍA-GIMENO, R.M., MARTÍNEZ, C.H., SILÓNIZ, M.I. Improving artificial neural networks with a pruning methodology and genetic algorithms for their application in microbial growth prediction in food. **International Journal of Food Microbiology**, v.72, p.19-30, 2002.

GARCÍA-GIMENO, R.M., HERVÁS-MARTÍNEZ, C., BARCO-ALCALÁ, E., ZURERA-COSANO, G., SANZ-TAPIA, E. An artificial neural network approach to *Escherichia coli* O157:H7 growth estimation. **Journal of Food Science**, v.68, p.639–645, 2003.

GEERAERD, A.H., VALDRAMIDIS, V.P., DEVLIEGHERE, F., BERNAERT, H., DEBEVERE, J., VAN IMPE, J.F. Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in

black box polynomial modelling. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, p.229-244, 2004.

GIANNUZZI, L., PINOTTI, A., ZARITZKY, N. Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated beef at different temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v.39, p.101-110, 1998.

GIBSON, A.M., BRATCHELL, N., ROBERTS, T.A. The effect of sodium chloride and temperature on rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. **Journal of Applied Bacteriology**, v.62, p.479–490, 1987.

GIL, M.M., BRANDÃO, T.R.S., SILVA, C.L.M. A modified Gompertz model to predict microbial inactivation under time-varying temperature conditions. **Journal of Food Engineering**, v.76, p.89-94, 2006.

GÖK, V., OBUZ, E., AKKAYA, L. Effects of packaging method and storage time on the chemical, microbiological, and sensory properties of Turkish pastirma—A dry cured beef product. **Meat Science**, v.80, p.335–344, 2008.

GOSPAVIC, R., KREYENSHIMIDT, J., BRUCKNER, S., POPOV, V., HAQUE, N. Mathematical modeling for predicting the growth of *Pseudomonas* spp. in poultry under variable temperature conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.127, p.290-297, 2008.

GRAY, J.I., GOMAA, E.A., BUCKLEY, D.J. Oxidative Quality and Shelf Life of Meats. **Meat Science**, v.43, p.111-123, 1996.

HAALAND, P.D. **Experimental Design in Biotechnology**. Marcel Dekker, INC., New York, USA. 1989.

HUANG, L. Estimation of growth of *Clostridium perfringens* in cooked beef under fluctuating temperature conditions. **Food Microbiology**, v.20, p.549-559, 2003.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v.49, p.S139- S150, 1998.

JUNEJA, V.K., MARKS, H.M. 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, 1999.

KITAKAWA, J.H.A. **Efeito do Lactato de Sódio na Vida de Prateleira de Lingüiça Mista Fresca**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil, 2002.

KORKEALA, H., BJORKROTH, K.J. Spoilage and contamination of vacuum-packaged cooked sausages: a review. **Journal of Food Protection**, v.60, p.724–731, 1997.

KORKEALA, H., LINDROTH, S. AHVENAINEN. R. ALANKO, T. Interrelationship between microbial numbers and other parameters in the spoilage of vacuum-packed cooked ring sausage. **International Journal of Food Microbiology**, v.5, p.311-321, 1987.

KOUTSOUMANIS, K.P., STAMATIOU, A.P., DROSINOS, E.H., NYCHAS, G.J.E. Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. **Food Microbiology**, v.25, p.915-921, 2008.

KOUTSOUMANIS, K., TAOUKIS, P.S., NYCHAS, G.J.E. Development of a Safety Monitoring and Assurance System for chilled food products. **International Journal of Food Microbiology**, v.100, p.253– 260, 2005.

KOUTSOUMANIS, K. Predictive Modeling of the Shelf Life of Fish under Nonisothermal Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.1821-1829, 2001.

KOUTSOUMANIS, K., NYCHAS, G.J.E. Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf life predictions. **International Journal of Food Microbiology**, v.60, p.171-184., 2000.

KREYENSCHMIDT, J., HUBNER, A., BEIERLE, E., CHONSCH, L., SCHERER, A., PETERSEN, B. Determination of the shelf life of sliced cooked ham based on the growth of lactic acid bacteria in different steps of the chain. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, p.510-520, 2010.

LABADIE, J. Consequences of packaging on bacterial growth: meat is an ecological niche. **Meat Science**, v.52, p.299-305, 1999.

LABUZA, T.P., FU, B. Growth kinetics for shelf-life prediction: theory and practice. **Journal of Industrial Microbiology**, v.12, p.309–323, 1993.

LEBERT, I., LEBERT, A. Quantitative prediction of microbial behavior during food processing using an integrated modeling approach: a review. **International Journal of Refrigeration**, v.29, p.968-984, 2006.

LEBERT, I., ROBLES-OLVERA, V., LEBERT, A. Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* in meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, p.27-39, 2000.

LEPORQ, B., MEMBRE, J.M., DERVIN, C., BUCHE, P., GUYONNET, J.P. The “Sym’Previs” software, a tool to support decisions to the foodstuff safety, **International Journal of Food Microbiology**, v.100, p.231-237, 2005.

LIU, F., YANG, R.Q., LI, Y.F. Correlations between growth parameters of spoilage micro-organisms and shelf-life of pork stored under air and modified atmosphere at -2, 4 and 10 °C. **Food Microbiology**, v.23, p.578–583, 2006.

LIU, H.L., LAN, Y.W., CHENG, Y.C. Optimal production of sulphuric acid by *Thiobacillus thiooxidans* using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v.39, p.1953-1961, 2004.

MANCINI, R.A., RAMANATHAN, R., SUMAN, S.P., KONDA, M.K.R., JOSEPH, P., DADY, G.A., NAVEENA, B.M., LÓPEZ-LÓPEZ, I. Effects of lactate and modified atmospheric packaging on premature browning in cooked ground beef patties. **Meat Science**, v.85, p.339–346, 2010.

MASSAGUER, P.R. **Microbiologia dos processos alimentares**. Editora Varela, São Paulo, SP, Brasil, 2005.

MATARAGAS, M., DROSINOS, E.H., VAIDANIS, A., METAXOPOULOS, I. Development of a Predictive Model for Spoilage of Cooked Cured Meat Products and Its Validation Under Constant and Dynamic Temperature Storage Conditions. **Journal of Food Science**, v.71, p.157-167, 2006.

McCLURE, P. J., BLACKBURN, C. de W, COLE, M., B., CURTIS, P. S, JONES, J. E, LEGAN, J. D, OGDEN, I. D, PECK, M. W, ROBERTS, T. A, SUTHERLAND, J. P, WALKER, S. J. Review Paper. Modelling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food Micromodel approach. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.265-275, 1994.

McDONALD, K., SUN, D.W. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.52, p.1–27, 1999.

McKELLAR, R. C., LU, X. **Modeling Microbial Response in Food**. CRC series in contemporary food science. CRC PRESS Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., 2004.

McMEEKIN, T.A., BOWMAN, J., MCQUESTIN, O., MELLEFONT, L., ROSS, T., TAMPLIN, M. The Future of Predictive Microbiology: Strategic research, innovative applications and great expectations. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, p.2–9, 2008.

McMEEKIN, T.A., BARANYI, J., BOWMAN, J., DALGAARD, P., KIRK, M., ROSS, T.; SCHMID, S., ZWIETERING, M.H. Information systems in food safety management. **International Journal of Food Microbiology**, v.112, p.181–194, 2006.

McMEEKIN, T.A., ROSS, T. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p.133-153, 2002.

McMEEKIN, T.A., OLLEY, J.N., ROSS, T., RATKOWSKY, D.A. In: **Predictive Microbiology: theory and Application**. Research Studies Press Ltd., John Wiley and Sons, New York, 1993.

MESSENS, W., VERLUYTEN, J., LEROY, F., VUYST, L. Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p.41–52, 2003.

MEZAROBA, M.E.P.C. Dados não publicados. Tese em desenvolvimento no laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2010.

MUERMANS, M.L.T., STEKELENBURG, F.K., ZWIETERING, M.H., HUIS IN 'T VELDT, J.H.J. Modeling of the microbiological quality of meat. **Food Control**, v.4, n° 4, p.216-221, 1993.

MÜRMAN, L., DILKIN, P., KOWALSKI, C.H., ALMEIDA, C.A., MALLMANN, C.A. Temperaturas de conservadores a frio em estabelecimentos que comercializam alimentos, na cidade de Santa Maria-RS. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo , v.18, n.124 , p.30-34, set. 2004.

NAKASHIMA, S.M.K., ANDRÉ, C.D.S., FRANCO, B.D.G.M. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.3, p.41-51, 2000.

NASRABADI, M.R.N., RAZAVI, S.H. Use of response surface methodology in a fed-batch process for optimization of tricarboxylic acid cycle intermediates to achieve high levels of canthaxanthin from *Dietzia natronolimnaea* HS-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.109 (4), p.361-368, 2010.

NAU, R.F. **What's the bottom line? How to compare models.** Disponível em: <<http://www.duke.edu/~rnau/compare.htm>>, <http://www.fuqua.duke.edu/faculty_research/faculty_directory/nau/>. Acesso em 16 de agosto de 2010.

NEUMEYER, K., ROSS, T., MCMEEKIN, T.A. Development of a predictive model to describe the effects of temperature and water activity on the growth of spoilage pseudomonads. **International Journal of Food Microbiology**, v.38, p.45–54, 1997.

NICOLAI, B.M.; VAN IMPE, J.F.; VERLINDEN, B.; MARTENS, T.; VANDEWALLE, J.; BAERDEMAEKER, J. Predictive modelling of surface growth of lactic acid bacteria in vacuum-packed meat. **Food Microbiology**, v.10, p.229-238, 1993.

NYCHAS, G.J.E., SKANDAMIS, P.N., TASSOU, C.C., KOUTSOUMANIS, K.P. Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, v.78, p.77-89, 2008.

PAL, A., LABUZA, T.P., DIEZ-GONZALEZ, F. Comparison of primary predictive models to study the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperature in liquid cultures and selection of fastest growing ribotypes in meat and turkey product slurries. **Food Microbiology**, v.25, p.460-470, 2008.

PARK, S.W., SOHN, K.H., SHIN, J.H., LEE, H.J. High hydrostatic pressure inactivation of *Lactobacillus viridescens* and its effects on ultrastructure of cells. **International Journal of Food Science and Technology**, v.36, p.775-781, 2001.

PELEG, M. **Advanced Quantitative Microbiology for Foods and Biosystems.** Models for Predicting Growth and Inactivation. CRS Series in Contemporary Food Science. Taylor & Francis Group. New York, USA, 2006.

PEXARA, E.S., METAXOPOULOS, J., DROSINOS, E.H. Evaluation of shelf life of cured, cooked, sliced turkey fillets and cooked pork sausages - piroski - stored under vacuum and modified atmospheres at +4 and +10°C. **Meat Science**, v.62, p.33-43, 2002.

PHUA, S.T.G., DAVEY, K.R. Predictive modeling of high pressure (≤ 700 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, 2007.

PIN, C., BARANYI, J., FERNANDO, G. Predictive model for the growth of *Yersinia enterocolitica* under modified atmospheres. *Journal of Applied Bacteriology*, v.88, p.521-530, 2000.

RAO, M.S., PINTADO, J., STEVENS, W.F., GUYOT, J.P. Kinetic growth parameters of different amylolytic and non-amylolytic *Lactobacillus* strains under various salt and pH conditions. **Bioresource Technology**, v.94, p.331–337, 2004.

RATKOWSKY, D.A., OLLEY, J., MCMEEKIN, T.A., BALL, A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures, **Journal of Bacteriology**, v.149, p.1-5, 1982.

RODRIGUES, M.I., IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Editora Casa do Pão. São Paulo, SP, Brasil, 2005.

RODRIGUES, L., TEIXEIRA J., OLIVEIRA, R., VAN DER MEI, H.C. Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. **Process Biochemistry**, v.41, p.1–10, 2006.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, M.R. **Desarrollo y validación de modelos matemáticos para la predicción de vida comercial de productos cárnicos**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade de Córdoba (UCO), Córdoba, Espanha, 2004.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, M.R., ZURERA-COSANO, G., GARCÍA-GIMENO, R.M., BARCO-ALCALÁ, E., CASTILLEJO-RODRÍGUEZ, A.M. Sensory and microbiological quality evaluation of vacuum-packed sliced cooked chicken breast. Shelf-life estimation. **Journal of Food Quality**, v.26, p.105-122, 2003.

ROSS, T., DALGAARD, P., TIENUNGOON, S. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, p.231–245, 2000.

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal of Applied Bacteriology**, v.81, p.501-508, 1996.

ROSS, T., McMEEKIN, T. A. Predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.241-264, 1994.

ROSSO, L. **Modélisation et microbiologie prévisionnelle: élaboration d'un nouvel outil pour l'agro-alimentaire**. Tese de Doutorado n°.197-95, Université Claude Bernard-Lyon I, 1995.

RUIZ-CAPILLAS, C., CARBALLO, J., COLMENERO, F.J. Biogenic amines in pressurized vacuum-packaged cooked sliced ham under different chilled storage conditions. **Meat Science**, v.75, p.397-405, 2007.

SALLAM, K.I. Chemical, sensory and shelf life evaluation of sliced salmon treated with salts of organic acids. **Food Chemistry**, v.101, p.592–600, 2007.

SAMELIS, J., KAKOURI, A., REMENTZIS, J. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. **Food Microbiology**, v.17, p.329-340, 2000.

SARMENTO, C.M.P. **Modelagem do Crescimento Microbiano e Avaliação Sensorial no estudo da Vida de Prateleira de mortadela e lingüiça defumada em armazenamento isotérmico e não isotérmico**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2006.

SAUCEDO-REYES, D., MARCO-CELDRÁN, A., PINA-PÉREZ, M.C., RODRIGO, D., MARTÍNEZ-LÓPEZ, A. Modeling survival of high hydrostatic pressure treated stationary- and exponential-phase *Listeria innocua* cells. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.10, p.135–141, 2009.

SHELEF, L.A. Antimicrobial effects of lactates. **Journal of Food Protection**, v.57, p.445-450, 1994.

SHIMONI, E., LABUZA, T. P. Modeling Pathogen Growth in Meat Products: Future challenges. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, p.394-402, 2000.

SLONGO, A.P. **Uso de alta pressão hidrostática em presunto fatiado: avaliação físico-química e sensorial e modelagem do crescimento microbiano.** Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2008.

SLONGO, A.P., ROSENTHAL, A., CAMARGO, L.M.Q., DELIZA, R., MATHIAS, S.P., ARAGÃO, G.M.F. Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. **LWT-Food Science and Technology**, v.42, p.303-306, 2009.

SMITH-SIMPSON, S., CORRADINI, M.G., NORMAND, M.D., PELEG, M., SCHAFFNER, D.W. Estimating microbial growth parameters from non-isothermal data: A case study with *Clostridium perfringens*. **International Journal of Food Microbiology**, v.118, p.294-303, 2007.

SOUZA, N.L. **Efeito da Combinação de Sal com Lactato e Diacetato de Sódio nas Características Sensoriais, Físico-Químicas, Cor e Textura de um Produto Similar à Carne-de-Sol.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil, 2005.

STONE, H., SIDEL, J. **Sensory evaluation practices.** Elsevier Academic Press. Terceira edição. Califórnia, USA, 2004.

SUTHERLAND, J.P., BAYLISS, A.J., ROBERTS, T.A. Predictive modeling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. **International Journal of Food Microbiology**, v.21 (3), p.217-236, 1994.

SUTTON, D.S., BREWER, M.S., MCKEITHZ, F.K. Effects of sodium lactate and sodium phosphate on the physical and sensory characteristics of pumped pork loins. **Journal of Muscle Foods**, v.8, p.95-104, 1997.

SWINNEN, I.A.M., BERNAERTS, E.J.J., DENS, A.H., GEERAED, J.F. VAN IMPE, J.F. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p.137-159, 2004.

TERRA, N.N. Apontamentos de Tecnologia de Carnes. Editora Unisinos. São Leopoldo, RS, Brasil, 2000.

UNE-EN ISO 6579. **Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.** Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). Madri, Espanha, 2002.

UNE-EN ISO 11290-2. **Método horizontal para la detección y recuento de *Listeria monocytogenes*.** Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). Madri, Espanha, 2000.

UNE ISO 87-004-79. **Análisis sensorial.** Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). Madri, Espanha, 1997.

VAIKOUSI, H., BILIADERIS, C.G., KOUTSOUMANIS, K.P. Applicability of a microbial Time Temperature Indicator (TTI) for monitoring spoilage of modified atmosphere packed minced meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.133, p.272–278, 2009.

VALERO, A., HERVÁS, C., GARCÍA-GIMENO, R.M., ZURERA-COSANO, G. Product unit neural network models for predicting the growth limits of *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v.24, p.452-464, 2007.

VALÍK, L., BARANYI, J., GÖRNER, F. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*. **International Journal of Food Microbiology**, v.47, p.141–146, 1999.

VALÍK, L., PIECKOVA, E. Growth modelling of heat-resistant fungi: the effect of water activity. **International Journal Food Microbiology**, v.63, p.11-17, 2001.

VAN IMPE, J.F., BART, M.N., SCHELLEKENS, M.; MARTENS, T., BAERDEMAEKER, J.A. Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. **International Journal of Food Microbiology**, v.25, p.227-249, 1995.

VAN IMPE, J. F., NICOLAI, B. M., MARTENS, T., BAERDEMAEKER, J., VANDEWALLE, J. Dynamic Mathematical Model to predict microbial growth and

Inactivation during food processing. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.9, p.2901-2909, 1992.

VELD, J.H.J. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. **International Journal of Food Microbiology**, v.33, p.1-18, 1996.

VELUGOTI, P.R., BOHRA, L.K., JUNEJA, V.K., HUANG, L., WESSELING, A.L., SUBBIAH, J., THIPPAREDDI, H. Dynamic model for predicting growth of *Salmonella* spp. in ground sterile pork. **Food Microbiology in press**, p.1-8, 2010.

WHITING, R.C., BUCHANAN, R.L. A classification of models in predictive microbiology e a reply to K.R. Davey. **Food Microbiology**, v.10, p.175-177, 1993.

WHITING, R.C. Microbial modelling in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, p.467-494, 1995.

WITTING DE PENNA, Q. Evaluación sensorial, una metódica que mide calidad. II. Evaluación de Calidad mediante el Test de Valoración con Escala de Karlsruhe. **Alimentos**, v.6, p.25-31, 1981.

ZHOU, G.H., XU, X.L., LIU, Y. Preservation technologies for fresh meat – A review. **Meat Science**, v.86, p.119-128, 2010.

ZHOU, K., CUI, T.T., LI, P.L., LIANG, N.J., LIU, S.C., MA, C.W., PENG, Z.H. Modelling and predicting the effect of temperature, water activity and pH on growth of *Streptococcus iniae* in Tilapia. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p.1956-1965, 2008.

ZIMMERMANN, M., MIORELLI, S., MASSAGUER, P.R., ARAGÃO, G.M.F. Modeling the influence of water activity and ascospore age on the growth of *Neosartorya fischeri* in pineapple juice. **LWT - Food Science and Technology**, In Press, Corrected Proof, 2010.

ZWIETERING, M. H., KOOS, J.T, HASENACK, B.E., WIT, J.C. de, van't RIET, K. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.1094-1101, 1991.

ZWIETERING, M.H., JONGEBURGER, I., ROMBOUTS, F.M., RIET, K.V. Modeling of bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.1875-1881, 1990.

ZURERA-COSANO, G., GARCÍA-GIMENO, R.M., RODRÍGUEZ-PÉREZ, R., HERVÁS-MARTÍNEZ C. Performance of response surface model for prediction of *Leuconostoc mesenteroides* growth parameters under different experimental conditions. **Food Control**, v.17, p.429-438, 2006.

ZURERA-COSANO, G., GARCÍA-GIMENO, R.M., RODRÍGUEZ-PÉREZ, M.R., HERVÁS-MARTÍNEZ C. Validating an artificial neural network modelo of *Leuconostoc mesenteroides* in vacuum packaged sliced cooked meat products for shelf life estimation. **European Food Research and Technology**, v.221, p.717-724, 2005.

ANEXOS

Anexo I

1. Ficha de avaliação sensorial do *chopped*.
2. Descrição dos atributos sensoriais do *chopped*.

Anexo II

1. Curva de calibração de *L. plantarum* a 30°C em meio MRS.

Anexo I

1. Ficha de avaliação sensorial do *chopped*.

CATA DE CHOPPED

Cuestionario de puntuación de las muestras

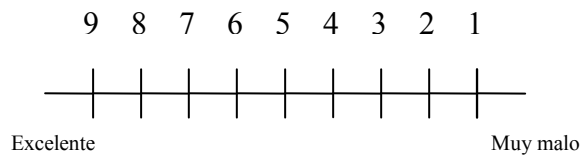
JUEZ:

FECHA:

Puntúe las siguientes muestras, tachando el valor asignado a cada atributo según su criterio.

ESCALA DE ATRIBUTOS:

Ver tabla atributos sensoriales de CHOPPED PORK



MUESTRA			9	8	7	6	5	4	3	2	1
		COLOR									
		ASPECTO									
Rechazo*		OLOR									
	Si	SABOR									
	No	ACEPTACIÓN GENERAL									

MUESTRA			9	8	7	6	5	4	3	2	1
		COLOR									
		ASPECTO									
Rechazo*		OLOR									
	Si	SABOR									
	No	ACEPTACIÓN GENERAL									

MUESTRA			9	8	7	6	5	4	3	2	1
		COLOR									
		ASPECTO									
Rechazo*		OLOR									
	Si	SABOR									
	No	ACEPTACIÓN GENERAL									

* Debajo del cuadro de Rechazo; intente razonar la razón del mismo

2. Descrição dos atributos sensoriais do *chopped*.

Atributos	Excelente 9	Muy buena 8	Buena 7	Satisfactoria 6	Regular 5	Suficiente 4	Defectuosa 3	Mala 2	Muy mala 1
Color	Excepcionalmente agradable. Muy Brillante. Típico. Tonalidades rosas.	Agradable. Brillante. Típico.	Brillante suave. Típico. Algo descolorido hasta rosa claro.	Brillante. Aún Típico. Color diferente al T ₀ . Rosa pálido. Irregular la tonalidad.	Poco Brillante. Algo típico. Decoloraciones en los bordes. Machas irregulares, opacas y paliduchas.	Sin Brillo. Decoloracion es más amplias, de los bordes al interior.	Atípico. Muy descolorido. Manchas abundantes en grises, verdosas, amarillentas, azuladas.	Opaco. Atípico. Deteriorado.	Completamente artificial. Muy deteriorado. Desagradable.
Aspecto	Completamente bien conservadas. Jugosas. Homogéneas.	Muy bien conservadas. Bordes continuos y definidos. Algo jugosa.	Bien conservado. Irregularidades en los bordes. Poco jugosa.	Aún conservadas. Separación de la grasa. Separaciones de los bordes.	Poco compacta claras diferenciación de dados de carne y grasa. Bordes rotos. Resequedad.	Poco compacta. No es desagradable. Muchos huecos. Grasa separada superficial.	No compacta. Zonas fácilmente separables. Huecos. Rancio.	Muy heterogénea. Desagradable.	Muy desagradable.
Olor	Excepcionalmente agradable.	Específico. Agradable. Bueno. Intenso.	Específico. Agradable. Poco intenso. Difuso.	Levemente perjudicado. Tenue. Más intenso en algunas zonas. Ácido.	Atípico (a cecinas = carne salada y seca). Daño del olor propio aceptable.	Atípico. Algo dañado: quemado, añejo, rancio, intenso, picante, a humo, amoniacal.	No típico. Completamente disminuido. Claramente alterado, rancio, fermentado.	Muy alterado. Desagradable. Putrefacto. Fermentado.	Repugnante.
Sabor	Excepcionalmente agradable. Típico. Intenso. Específico. Apetecible.	Típico. Bueno. Gustoso. Sabor persistente.	Típico. Aún apetecible. Agradable.	Levemente perjudicado. Sabor aún agradable.	Daño del sabor propio. Aún aceptable.	Claramente dañado. Rancio. Picante. Disminuido.	Rancio. Disminuido. Alterado.	Muy alterado. Desagradable. Rancio. Fermentado.	Extraño. Desagradable. Putrefacto.

Anexo II

1. Curva de calibração de *L. plantarum* a 30°C em meio MRS.

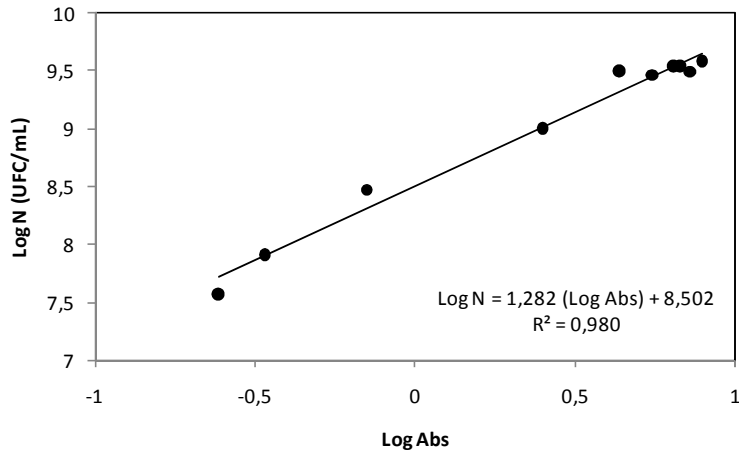


Figura 1. Relação entre a concentração celular (Log N (UFC/mL)) e os dados de absorvância (Log Abs) de *Lactobacillus plantarum* a 30°C em meio MRS.