

Efecto de las características de permeabilidad del envase sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes*

Enric Riera Valls

Enero 2013

Actividades de agua que inhiben el crecimiento de Algunos microorganismos

<i>Microorganism Inhibited</i>	<i>aw</i>
Clostridium botulinum A, B	.97
Clostridium botulinum E	.97
Pseudomonas fluorescens	.97
Clostridium perfringens	.95
Escherichia coli	.95
Salmonella	.95
Vibrio cholerae	.95
Bacillus cereus	.93
Listeria monocytogenes	.92
Bacillus subtilis	.91
Staphylococcus aureus	.86[5]
Most molds	.80[5]
No microbial proliferation	.50

Valores de actividad de agua para el crecimiento de algunos

microorganismos

Table 3-2. Approximate aw values for growth of selected pathogens in food.

Organism	Minimum	Optimum	Maximum
Campylobacter spp.	0.98	0.99	
Clostridium botulinum type E*	0.97		
Shigella spp.	0.97		
Yersinia enterocolitica	0.97		
Vibrio vulnificus	0.96	0.98	0.99
Enterohemorrhagic Escherichia coli	0.95	0.99	
Salmonella spp.	0.94	0.99	>0.99
Vibrio parahaemolyticus	0.94	0.98	0.99
Bacillus cereus	0.93		
Clostridium botulinum types A & B**	0.93		
Clostridium perfringens	0.943	0.95-0.96	0.97
Listeria monocytogenes	0.92		
Staphylococcus aureus growth	0.83	0.98	0.99
Staphylococcus aureus toxin	0.88	0.99	

ICMSF 1996.

* proteolytic; * non-proteolytic

<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm094145.htm>

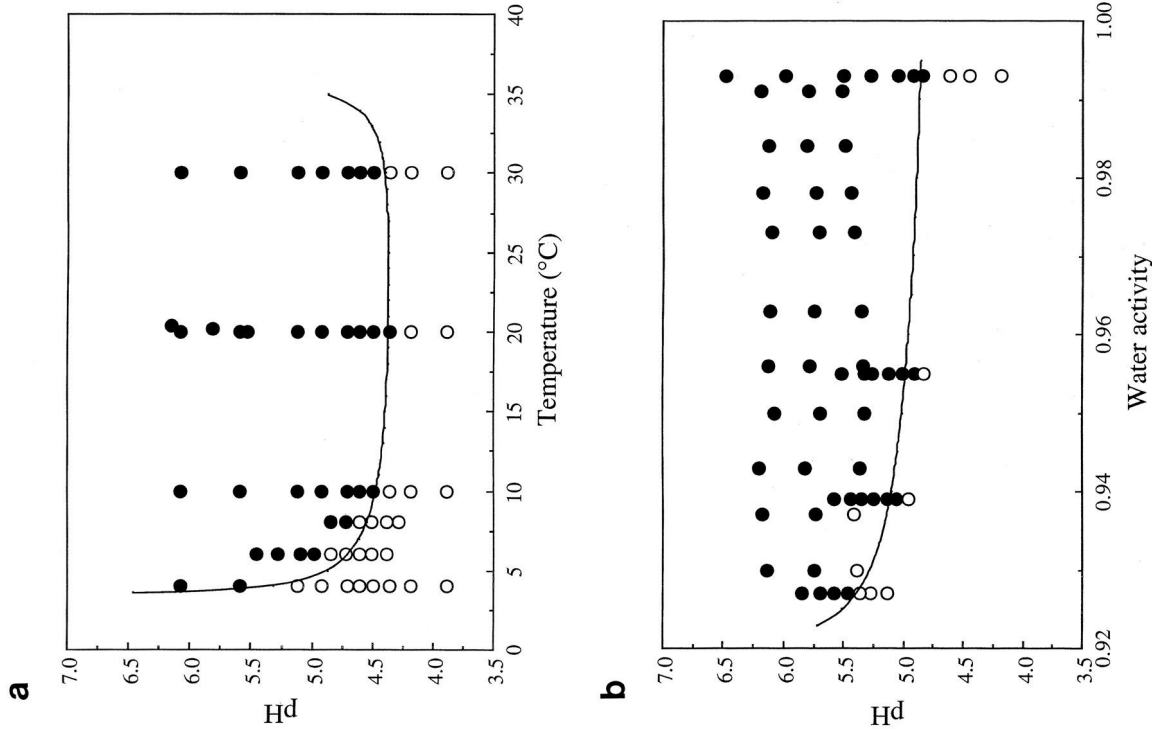
pH. Valores mínimos para el crecimiento de algunos microorganismos importantes en los productos cárnicos curados

Minimum pH values for growth for the relevant microorganisms

Clostridium perfringens	5.0
Campylobacter	4.9
Clostridium botulinum (proteolytic)	4.6
E. coli O157:H7	4.0-4.4
Pseudomonas	4.4
Listeria monocytogenes	4.4
Yersinia enterocolitica	4.2
Staphylococcus aureus	4.0
Salmonellae	3.8
Most LAB	3.0-3.5
Aspergillus flavus	2.0

<http://www.meathaccp.wisc.edu/validation/assets/Principles%20for%20preservation.pdf>

Selected growth/no growth interfaces ($P = 0.5$) predicted by equation 4 for *L. monocytogenes*, compared to the data used to generate the model.



(a) Temperature/pH interface predicted by equation 4 fitted to data for *L. monocytogenes* Scott A compared to observed growth responses of that strain in TSB-YE with added salt ($a_w = 0.993 \pm 0.001$) and without added lactate. Growth (●) or no growth (○) within 90 days is shown. (b) pH/water activity interface predicted by equation 4 fitted to data for *L. monocytogenes* Scott A compared to observed growth responses of that strain in TSB-YE in the presence of 50 mM lactate at 20°C. Growth (●) or no growth (○) within 90 days from probabilistic and kinetic experiments, respectively, is shown.

Tienungoon S et al. Appl. Environ. Microbiol. 2000;66:4979-4987

Applied and Environmental Microbiology

Problemática del crecimiento de *L. monocytogenes* en productos cárnicos curados

1. Crecimiento durante el secado: Durante una buena parte del mismo, la actividad del agua permite el crecimiento de *L. monocytogenes* y hay que tener en cuenta el riesgo correspondiente
2. Crecimiento durante la distribución
 1. Si el producto se ha dejado a una a_w mayor que 0,91, que permite el crecimiento, éste puede producirse
 2. Si el producto se ha secado hasta una humedad que no permite el crecimiento, pueden darse dos situaciones:
 1. Producto distribuido a temperatura ambiente: Puede suponerse una temperatura media de 20°C y una HR del orden de 60% - 80% Cabe esperar que el producto se seque y no presente peligro de multiplicación
 2. Producto a distribuir refrigerado: Incluso con una humedad relativa muy baja en el aire ambiente, por ejemplo del 50% a la temperatura del frigorífico, del orden de 2 – 5 °C es inferior al punto de rocío y por lo tanto la HR en la nevera será próxima a l 100%

Evolución de la aw durante el secado: Valores típicos

Días	% sal					
	2		2,75		3,3	
	<u>aw</u>	<u>pH</u>	<u>aw</u>	<u>pH</u>	<u>aw</u>	<u>pH</u>
1	0,975	4,99	0,978	5,48	0,93	5,51
4	0,975	5,66	0,97	5,77	955	5,79
11	0,955	4,84	0,95	4,86	0,93	4,87
13	0,955	4,84	0,95	4,86	0,93	4,87
18	0,938	4,92	0,931	4,89	0,939	4,89
20	0,96	4,84	0,945	4,7	0,925	4,87
25	0,938	4,77	0,935	4,78	0,925	4,76
27	0,952	4,71	0,937	4,7	0,922	4,77
32	0,93	4,9	0,938	4,83	0,926	4,79
40	0,929	4,84	0,949	4,81	0,902	4,79
74	0,88	4,81	0,87	43,92	0,87	4,82

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1255518/?page=4>

Evolución de la humedad en el secado de jamón

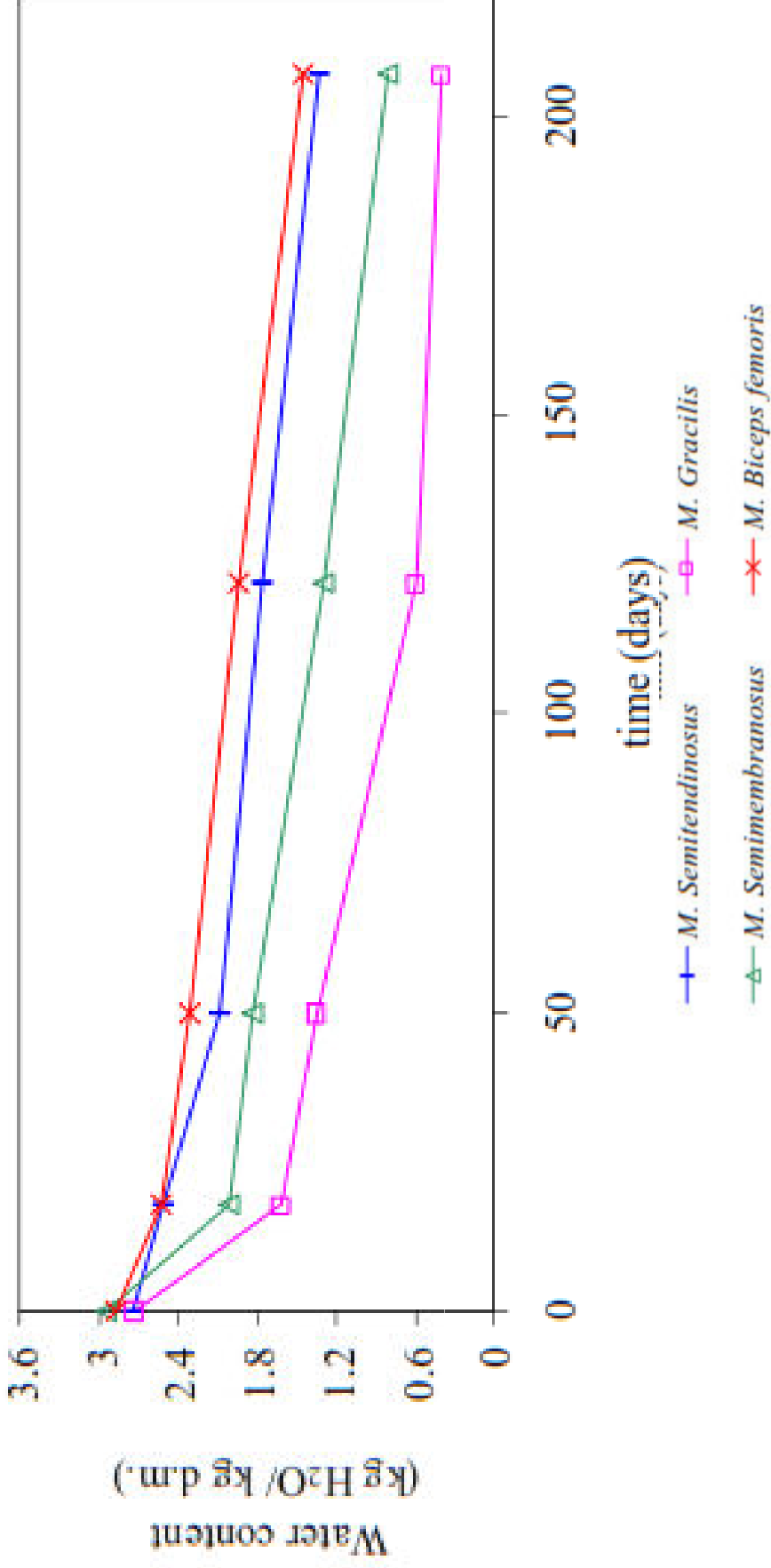


Figure 1.1.1 Evolution of water content, NaCl content and pH in different ham muscles during drying process (Arnau *et al.* 1995).

<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6675/11ProcesIntroduccio.PDF?sequence=11>

Salchichón fileteado: Valores típicos de aw y pH

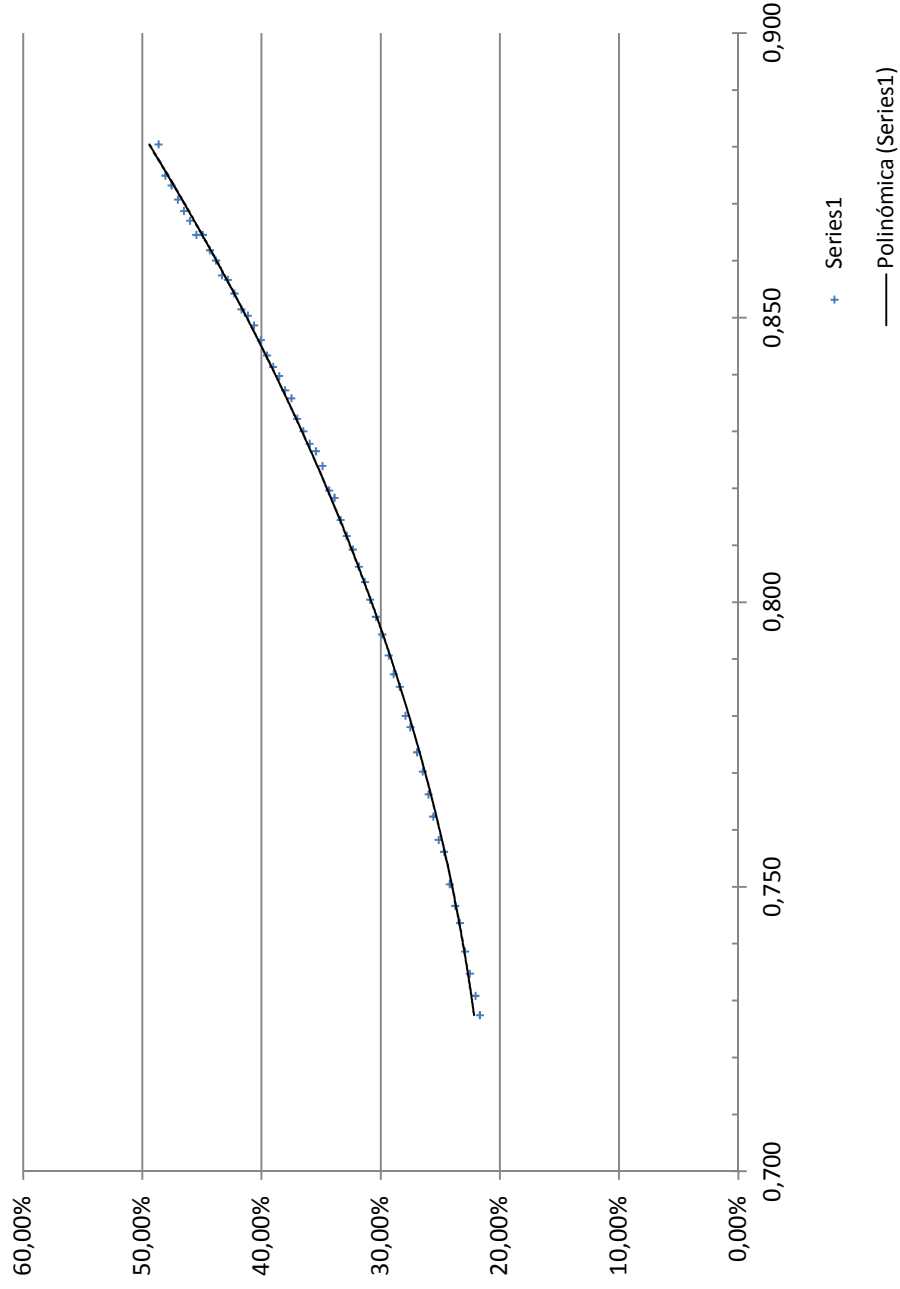
TABLA 1									
Secado	Lote	Diam.	Tiempo secado días	Merma secado %	a _w fin secado	pH			
						Antes del secado	Fin del secado	Conservación 3 meses	
									1 °C
Tradicional	1	80	38	28,6	0,907	5,32	4,89	5,00	4,70
	2	80	38	26,5	0,917	5,21	4,85	4,99	4,63
"QDS process"	1	80	<1	30,7	0,902	5,32	5,25	5,14	4,99
	2	80	<1	32,8	0,887	5,21	5,15	5,20	5,15

▲ Tabla 1. Promedio de merma alcanzada según los distintos procesos de secado y pH de los salchichones en los distintos momentos del muestreo.

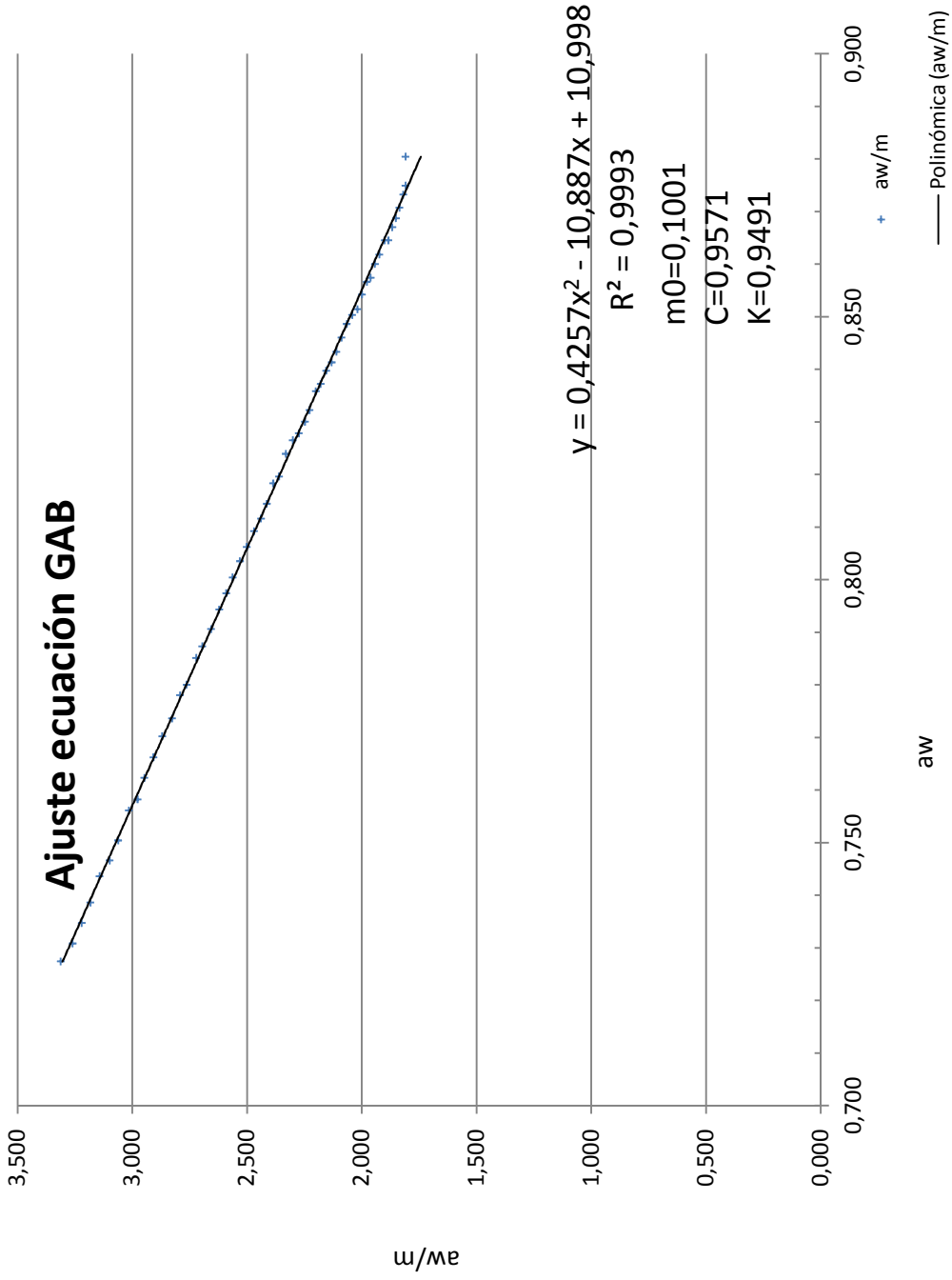
<http://ca.metalquimia.com/upload/document/article-es-18.pdf>

Longaniza fileteada: Isotherma de desorción:

Isoterma desorción 11 enero 2013



Longaniza fileteada: Ajuste a la ecuación de GAB



Efecto de la a_w sobre el crecimiento de *S. aureus*

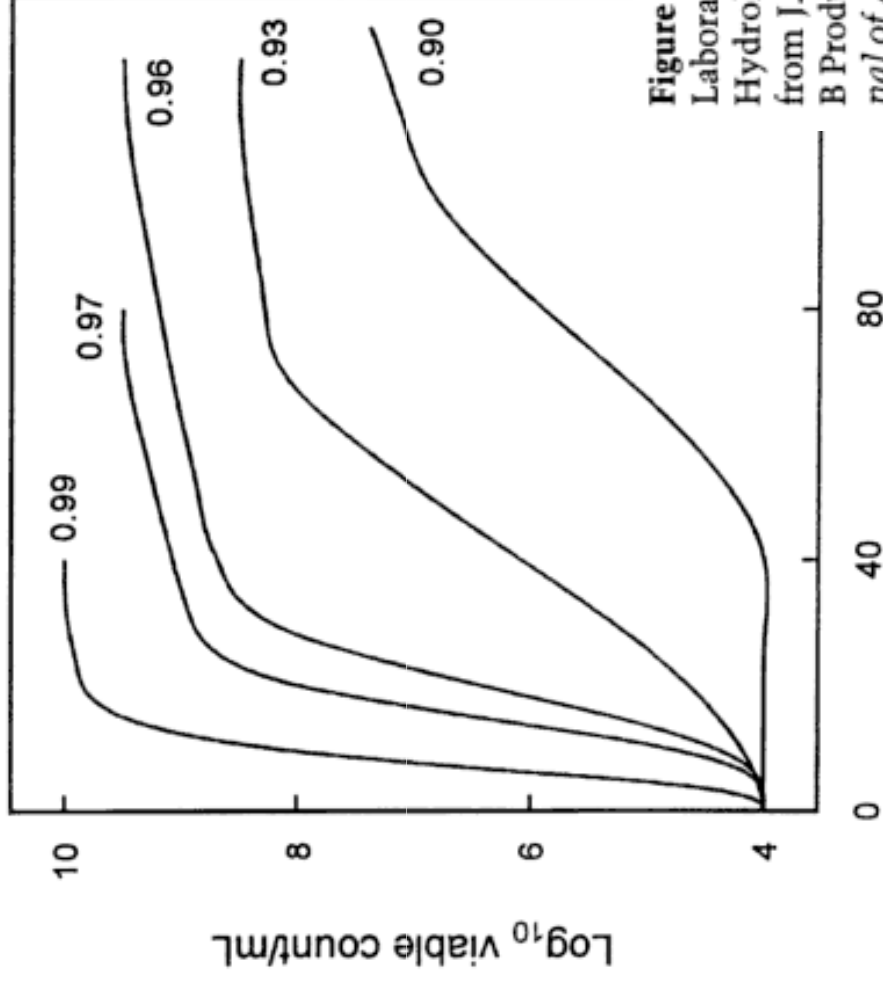
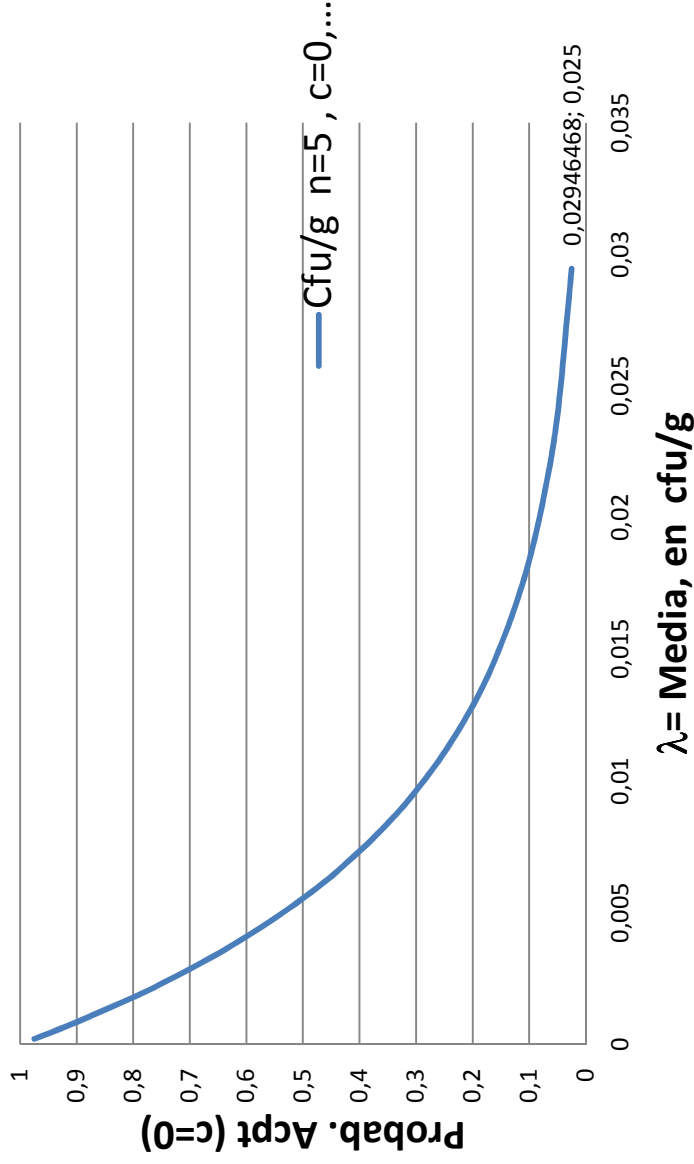


Figure 7-4 Growth Curves of *Staphylococcus aureus* in Laboratory Medium Adjusted to Various Levels of a_w with Hydrolyzed Protein. Source: Adapted with permission from J.A. Troller, Effect of Water Activity on Enterotoxin B Production and Growth of *Staphylococcus Aureus*, *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 21, pp. 435-439, © 1971, American Society for Microbiology.

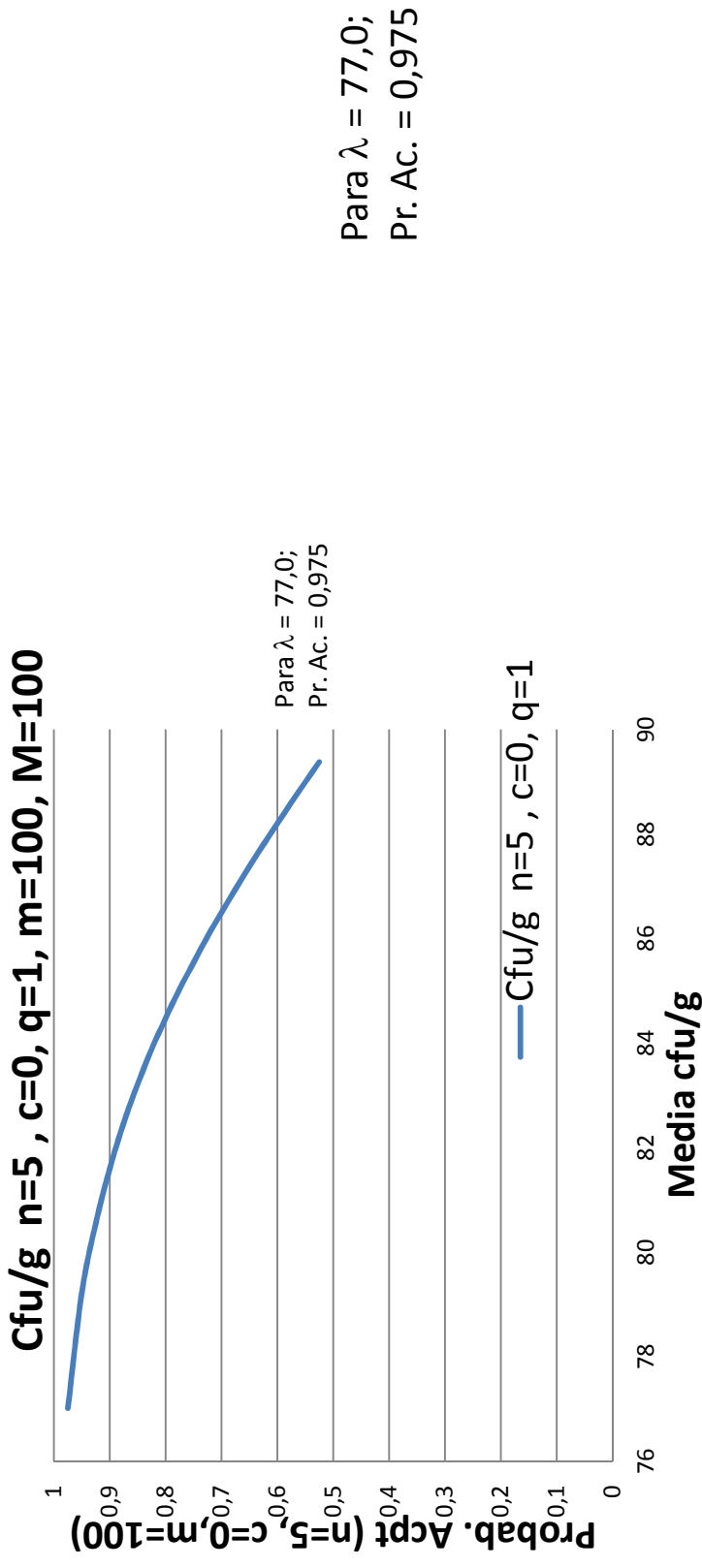
Curva característica de operación, para producto antes de distribuir

Cfu/g $n=5$, $c=0$, $q=25$



REGLAMENTO (CE) N° 1441/2007 DE LA COMISIÓN de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) no 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios: 1.2 b Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de L. monocytogenes, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales: Antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria

Curva característica de operación, para producto al final de la vida útil



Para $\lambda = 77,0$;
Pr. Ac. = 0,975

REGLAMENTO (CE) N° 1441/2007 DE LA COMISIÓN de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) no 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios: 1.2 b Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de L. monocytogenes, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales: Productos comercializados durante su vida útil

ComBase, T=7°C, aw=.95, Lactic acid = 0 ppm

enric.nera@crecea.upc.edu Browser Predictive Models Resources My account

ComBase Predictive Models

Predictive Models About Help

Growth Model

Temperature **Water Activity** **Observation Duration**

Static Changing
 NaCl Aw
 Time(h)

Listeria monocytogenes/Innocua with lactic(ppm)

Initial level:
 Phys.state: [0-1] B5Bp
 T (°C): [1-48]
 pH: [4-7.5]
 Aw: [0.001-1]
 lactic(ppm): [0-20000]
 Max. rate (log. conc/h):

Delt.time (hours):

remove last row Add a row

Predictions

Time (h)	Conc (Log10 cells/g)
0.00	0.00
0.00	0.00
4.80	0.00
9.60	0.00
14.40	0.00
19.20	0.00
24.00	0.00

ComBase: Ajuste de ecuación

10/1/13 modeling.combase.com/ComBase.aspx

ComBase comBase Edition

2013/01/01 About the model 2013 Help

1. Input your data

1	24
2	38.3
3	70
4	11.5
5	40.3
7	44.5
8	48.3
9	50
10	50
12	30
14	54.5
15	50

Empty data

2. Choose a model

Binary and logistic Least-squares of nonlinear models

Complete model Trophic

No sig Approx the log

No asymptote Linear

3. Fit the data

PL

Converging rates

Iteration	0.0047
CV of fit	1.7842

Estimated parameters and standard errors

Intercept	1.2851
ln(N) intercept	0.3455
Maximum / K0	1.2851
Start value	0.0047

1	24
2	38.3
3	70
4	11.5
5	40.3
7	44.5
8	48.3
9	50
10	50
12	30
14	54.5
15	50

PMP70 T=7°C; aw=.99;NO2Na=0ppm

Input Conditions

- Microorganism: Aerobic Anaerobic
- Temperature: Range: 4 to 37 °C, Value: 7.0 °C, 44.6 °F
- pH: Range: 4.5 to 7.5, Value: 6.5
- Water Activity: Range: 0.928 to 0.997, Value: 0.99
- Sodium Nitrite (ppm): Range: 0 to 150, Value: 0

Calculate Growth Data

Initial Level
log(CFU/ml) 1000 CFU/ml

Level of Concern
log(CFU/ml) 1,000,000 CFU/ml

Microorganism: *Listeria monocytogenes (Broth Culture) (aW)*

Source and/or Relevant Publications
R.L. Buchanan, H.G. Stahl and R.C. Whiting, Effects and Interactions of Temperature, pH, Atmosphere, Sodium Chloride, and Sodium Nitrite on the Growth of *Listeria monocytogenes*: Journal of Food Protection (1989) 52(12):844-851 - http://www.arsanow.com/MES/HTML/ERDCB_ibe/5/125.pdf

Calculate Model with: Lag No Lag

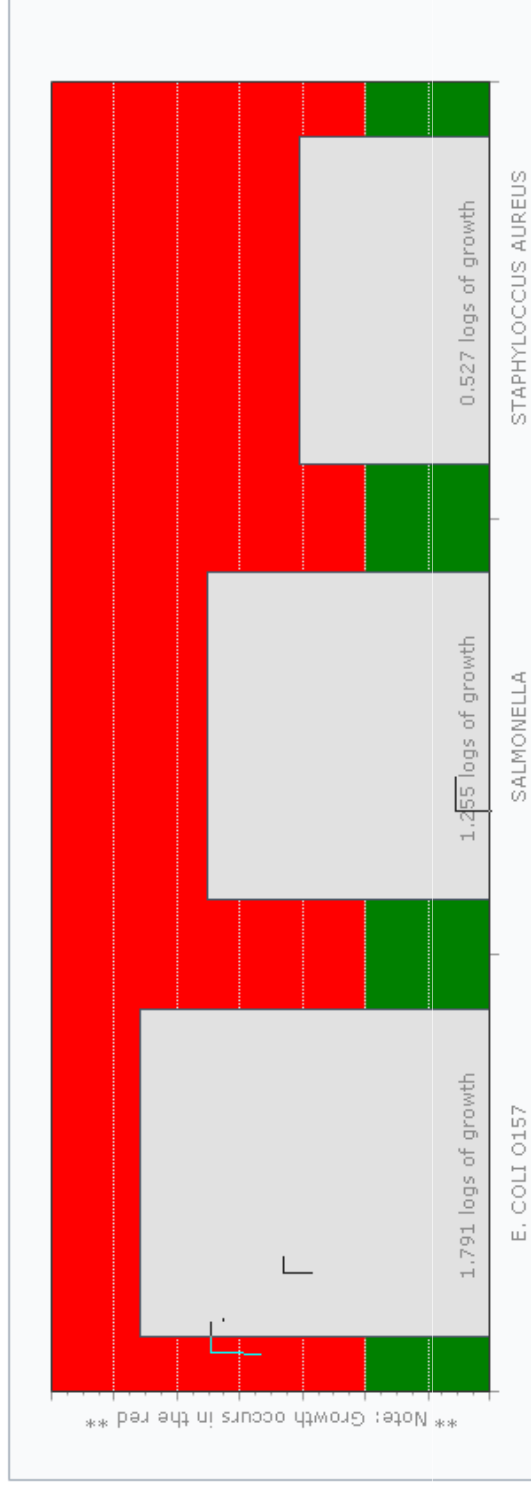
Time Scale: Days Hours

Modeled Growth Parameters:

Parameter	Hours
Lag Phase Duration:	39.7
Lower Confidence Limit:	37.0
Upper Confidence Limit:	42.6
Generation Time:	6.8
Lower Confidence Limit:	6.4
Upper Confidence Limit:	7.2
Time to Increase 3.0 logs:	107.4
Lower Confidence Limit:	101.2
Upper Confidence Limit:	114.0

Graph: *Listeria monocytogenes in Broth Culture (aW)*
Y-axis: log(CFU/ml) (0 to 10)
X-axis: Hours (0 to 250)
Legend: log(CFU/ml) (solid line), ICI (dashed line)

BEEF



E. COLI O157

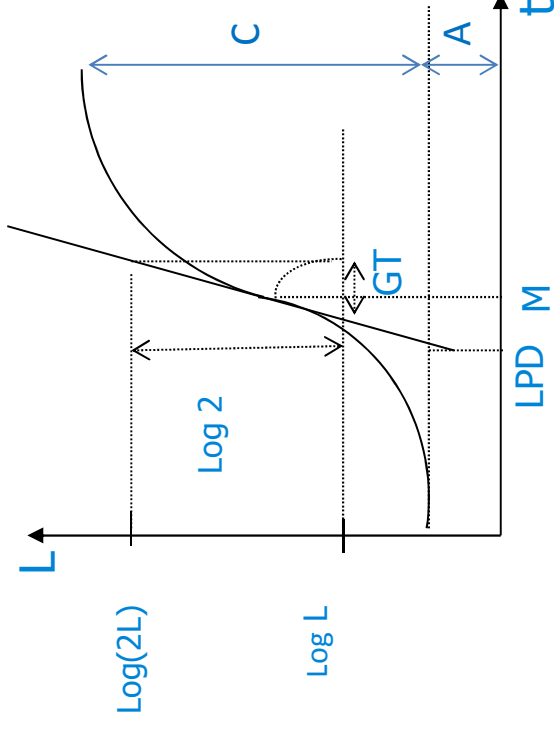
Date	Time	Temp (F)	Temp (C)	Interval (mins)	Temp used (F)	Temp used (C)	Rate	LPD	% LP in interval	Cum. % LP	Growth in interval	Cum. growth
1/9/2013	12:00 AM	68	20									
1/9/2013	1:00 AM	77	25	60	77	25	0.00419	145	41.4	41.4		
1/9/2013	2:00 AM	86	30	60	86	30	0.00677	96	62.5	100	0.025	0.025
1/9/2013	3:00 AM	95	35	60	95	35	0.01472	78	76.9		0.883	0.908
1/9/2013	4:00 AM	95	35	60	95	35	0.01472	78	76.9		0.883	1.791

Ecuación de Gompertz

$$L(t) = A + C * e^{-e^{-B(t-M)}}$$

$$\ln \ln \frac{C}{L(t) - A} = BM - Bt$$

$$t = M - \frac{1}{B} \ln \ln \frac{C}{L(t) - A}$$



$L(t)$ = Log del contaje de bacterias al tiempo t (horas), $\log(\text{cfu/ml})$

A = Valor asintótico del log del contaje, cuando el tiempo tiende a cero (Contaje inicial), $\log(\text{cfu/ml})$

C = Valor asintótico del log del crecimiento, cuando el tiempo tiende a infinito (Número de ciclos logarítmicos de crecimiento), $\log(\text{cfu/ml})$

M = Tiempo al cual la velocidad absoluta de crecimiento es máxima (h)

B = Velocidad relativa de crecimiento, al tiempo M , $(\log(\text{cfu/ml})/h)$

Ecuación de Gompertz: Magnitudes cinéticas derivadas

Ecuaciones cinéticas derivadas:

Velocidad de crecimiento exponencial (EGR) = BC/e (1)

Tiempo de generación (GT) = $(e/BC)\log(2)$ (2)

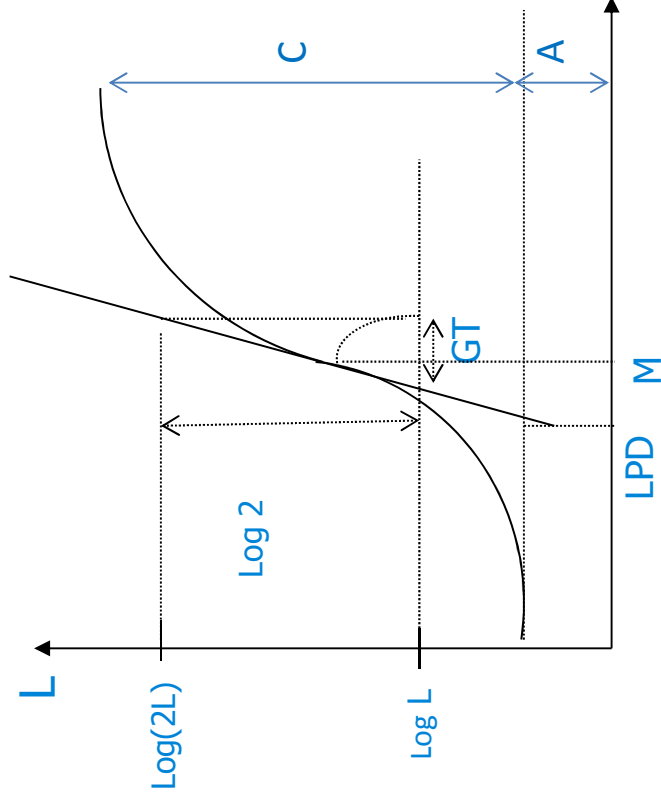
Duración de la fase lag LPD) = $M-1/B$

Densidad máxima de la población (MPD) = $A+C$

$$tga = \mu = \frac{\log 2}{GT} \Rightarrow GT = \frac{\log 2}{\mu} = \frac{e \cdot \log 2}{B \cdot C}$$

$$LPD = M - \frac{C \cdot e^{-1}}{\mu} = M - \frac{C \cdot e^{-1}}{B \cdot C \cdot e^{-1}} = M - \frac{1}{B}$$

$$\frac{dL}{dt} = BCe^{B(M-t)} e^{-e^{B(M-t)}} ; t = M \Rightarrow \frac{dL}{dt} = \mu = B \cdot C \cdot e^{-1}$$



Función de Gompertz: Modificación de Zwietering y otros (1990)

La forma de la ecuación es la misma, pero los cambios de variables dan los significados físicos de cada parámetro de forma más explícita

$$\log N = \log N_0 + A \cdot \exp \left[- \exp \left[\left(\mu_{\max} \cdot 2.7182 \cdot \frac{\lambda - t}{A} \right) + 1 \right] \right]$$

N_0 is the initial level of the microbial count (cfu/g), A is the maximum bacterial load attained at the stationary phase (cfu/g), μ_{\max} is the maximum growth rate (D

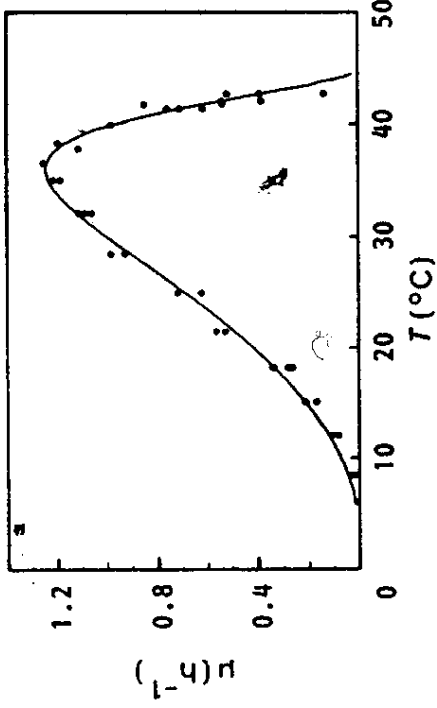
Log[cfu/g]/day), λ is the lag time (day), and t is the time (day).

Aplicando la ecuación al tiempo final de la durabilidad, t_{sl} y a un tiempo cualquiera, t se obtiene la expresión para el conteo al tiempo t en función del conteo máximo final y el tiempo de durabilidad del producto:

$$\log N = \log N_{\max} + A \cdot \exp \left[- \exp \left[\left(\mu_{\max} \cdot 2.7182 \cdot \frac{\lambda - t_{sl}}{A} \right) + 1 \right] \right] - A \cdot \exp \left[- \exp \left[\left(\mu_{\max} \cdot 2.7182 \cdot \frac{\lambda - t}{A} \right) + 1 \right] \right]$$

MATTEO ALESSANDRO DEL NOBILE y otros (2009) " STRATEGIES FOR PROLONGING THE SHELF LIFE OF MINCED BEEF PATTIES" Journal of Food Safety 29 (2009) 14-25;

Crecimiento de microorganismos: Efecto de la temperatura: Ecuación de Ratkowsky



Resolución de la ecuación simplificada.

A temperaturas inferiores a la óptima, el segundo término es negligible y la ecuación queda :

$$\sqrt{\mu} = b(T - T_{min})$$

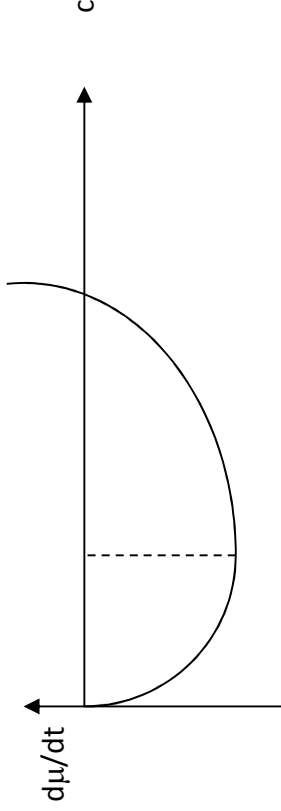
que puede resolverse por regresión lineal

$$\mu = (b(T - T_{min})) \{1 - \exp [c(T - T_{max})]\}^2 \dots\dots\dots(1)$$

Resolución de la ecuación completa:

A la temperatura óptima: $\frac{d\mu}{dT} = 0$, que lleva a :

$$1 - (cT_{opt} - cT_{min} + 1) * \exp[c(T_{opt} - T_{max})] = 0 \dots\dots\dots(2)$$

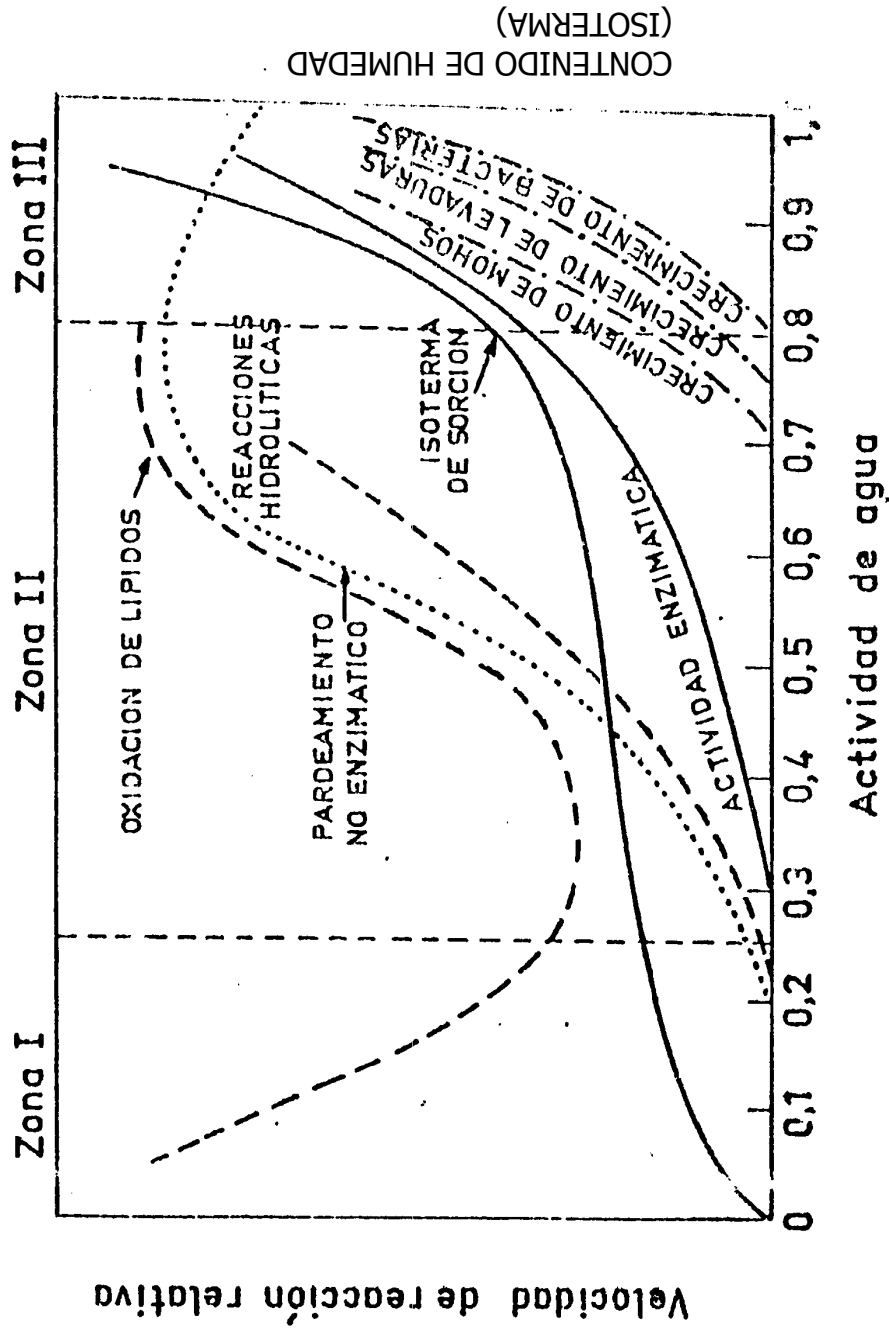


Esta ecuación tiene una solución trivial, $c = 0$ más un mínimo

$$\text{en : } c(\text{min.ecuac.deriv.}) = \frac{1}{T_{max} - T_{opt}} - \frac{1}{T_{opt} - T_{min}}$$

- a) Resolver la ecuación (2) por aproximaciones sucesivas, a partir del valor de c en el mínimo (la ecuación es monótona creciente a partir del mínimo, en el cual es negativa) y el punto siguiente en que se hace > 0
- b) Con el valor de c , si se sabe la velocidad de división a T_{opt} , despejar b de la ecuación (1)

Efecto de la actividad del agua sobre las velocidades de alteración de los alimentos



Ecuaciones para las isotermas de sorción: Ecuaciones de BET y de Kuhn

Ecuación de B.E.T.

$$\frac{m}{m_0} = \frac{C^* a_w}{(1 - a_w)^* (1 + (C - 1)^* a_w)}$$

Forma para cálculo :

$$\frac{a_w}{(1 - a_w)m} = \frac{1}{m_0 C} + \left[\frac{C - 1}{m_0 C} \right] a_w$$

Parámetros estimados para la forma :

$$y = b_0 + b_1 x$$

$$C = \frac{b_1}{b_0} + 1; m_0 = \frac{1}{b_0 + b_1}$$

Ecuación de Kuhn :

$$m = \frac{a_1}{\ln(a_w)} + a_2$$

Isotermas de sorción: Ecuación GAB

Ecuación de G.A.B.

$$\frac{m}{m_0} = \frac{CKa}{(1 - Ka)(1 - Ka + CKa)}$$

que puede reordenarse :

$$\frac{a}{m} = \frac{1}{m_0 CK} + \frac{(C - 2)}{m_0 C} a + \frac{K(1 - C)}{m_0 C} a^2$$

esta ecuación

puede ajustarse por métodos de regresión lineal :

$y = b_0 + b_1 x + b_2 x^2$ los coeficientes obtenidos se

transforman en los parámetros de la ecuación GAB :

$$m_0 = \frac{1}{\sqrt{b_1^2 - 4b_0 b_2}}$$

$$K = \frac{-2b_2}{\sqrt{b_1^2 - 4b_0 b_2} + b_1} = \frac{\sqrt{b_1^2 - 4b_0 b_2} - b_1}{2b_0}$$

$$C = \frac{2}{1 - \frac{b_1}{\sqrt{b_1^2 - 4b_0 b_2}}} = \frac{2\sqrt{b_1^2 - 4b_0 b_2}}{\sqrt{b_1^2 - 4b_0 b_2} - b_1}$$

A temperaturas no superiores a 40°C, el efecto de la temperatura sobre las constantes de la ecuación de GAB puede determinarse por:

$$\ln C_H = \frac{1279.3}{T} - 1.966$$

$$X_m = -0.054T + 22.54$$

$$\ln K = 0.0012T + 0.377$$

<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6675/11ProcesIntroduccio.PDF?sequence=15>

Crecimiento de microorganismos: Ecuaciones propuestas para el tiempo lag

$$\ln(l) = a + \frac{b}{T} \quad (1)$$

$$\ln(l) = a + \frac{b}{T} + \frac{c}{T^2} \quad (2)$$

$$\ln(l) = a + bT + cT^2 \quad (3)$$

$$\ln(l) = (b(T - T_0))^2 \quad (4)$$

$$\ln(l) = \frac{a(T - T_0)}{b + T - T_0} \quad (5)$$

where l = lag time; T = temperature; a, b, c, T_0 = regression constants.

(1) Arrhenius; (2) Davey; (3) Superficie de respuesta; (4) Ratkowsky; (5) WLF (Williams-Landel-Ferry)

Otros modelos

Nombre del modelo	Aplicable a:	Ecuación:	Constantes y símbolos	Limitaciones
Arrhenius	MO, F-Q	$k = A * e^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)}$	<p>E_a = Energía de activación $R = 8.814$ J/mol/°K</p>	Intervalos de temperatura estrechos, de hasta 10-15 C En crecimiento de MO, sólo hasta unos °C por debajo de la temperatura óptima de crecimiento
Davey	MO	$\ln k = C_0 + C_1/T + C_2/T^2 + C_3 a_w + C_4 a_w^2$		
Ratkowsky o de la raíz cuadrada	MO	$\sqrt{k} = b(T - T_{min})$	<p>T_{min} = Límite inferior de la temp. de crecimiento (k=0)</p>	Hasta la temperatura óptima de crecimiento A temperaturas próximas a T_{min} , tiende a dar valores superiores a los experimentales
Ratkowsky, ampliada	MO	$\sqrt{k} = b(T - T_{min}) \{1 - \exp[c(T - T_{max})]\}$		
Mc Meekin	MO	$\sqrt{k} = C \sqrt{a_w - \text{Min}(a_w)} (T - T_{min})$		Cualquier intervalo de T y a_w en el que haya crecimiento. No extrapolar fuera de los intervalos experimentales
Q_{10}	MO F-Q	$Q_{10} = \exp\left(\frac{10E_a}{RT(T+10)}\right) = \frac{(T+10 - T_{min})^2}{(T - T_{min})^2}$		Aumento de la constante de reacción, por cada 10 C de aumento de la temperatura

Ejemplos de velocidades de crecimiento de *L. monocytogenes*

Food Category	Reference	Food	Literature Values		EGRc at 5 °C (log10cfu/day)
			Temperature	Growth Rate a,b	
Frankfurters	Glass and Doyle, 1989	frankfurters	4.4 °C	2.3 logs in 6 weeks	0.064
	McKellar et al., 1994.	frankfurters	5 °C	3.5 logs in 21 days	0.168
	McKellar et al., 1994.	poultry wieners	5 °C	3.5 logs in 21 days	0.090
	Wederquist et al., 1994	turkey	4 °C	7.0 logs in 55 days	0.181
	Bedie et al., 2001	Pork frankfurters	4 °C	3.8 logs in 35 days	0.154
	Glass and Doyle, 1989	Summer sausage	4.4 °C	No change in 12 weeks	0.000
Dry/Semi-Dry Fermented Sausages	Hugas, 1995	Fermented sausage	12 to 14 °C	1.25 logs decrease in 25 days	-0.02
	Farber et al., 1993	German-style American Italian sausage	4 °C	Approximately 1 log in 4 weeks	-0.036
	Nisson, 1998	Norwegian fermented dry sausage	4 °C	1 log in 5.5 months	-0.006