

Zastosowanie mikrobiologicznych modeli prognostycznych w produkcji bezpiecznej żywności

JAROSŁAW KOWALIK, ADRIANA ŁOBACZ,
ANNA SYLWIA TARCZYŃSKA, STEFAN ZIAJKA

Katedra Mleczarstwa i Zarządzania Jakością UWM, ul. Oczapowskiego 7, 10-719 Olsztyn

Kowalik J., Łobacz A., Tarczyńska A. S., Ziajka S.

Application of microbiological predictive models in safe food production

Summary

The improvement of the microbiological quality of food products on the Polish market is a result of the systematic introduction and improvement of food safety assurance systems. The present paper discusses tools of predictive microbiology, i.e. software packages included in ComBase (www.combase.cc). These tools allow for quantitative assessment of microbiological hazard, like the presence of food borne pathogens in dairy products. The example of predicting the growth of bacteria from the species of *Yersinia enterocolitica* in cottage cheese during a few stages of production is presented. Tools in the form of software packages predicting the growth of microorganisms enable supporting the food safety assurance systems at every stage of production.

Keywords: predictive microbiology, ComBase, food safety, *Yersinia enterocolitica*

W dobie postępującej globalizacji, zaistniałych w ostatnim czasie kryzysów żywnościowych i coraz większej skali międzynarodowego handlu żywnością, producenci żywności stają przed nowymi wyzwaniami związanymi z zapewnieniem bezpieczeństwa żywności. Poprawa jakości mikrobiologicznej produktów spożywczych umieszczanych na rynku wynika z wdrożenia i ciągłego udoskonalania systemów zarządzania jakością (12, 14). Podstawowymi systemami, które mają za zadanie zapewnić bezpieczeństwo zdrowotne żywności są: GHP, GMP oraz obligatoryjny w Polsce od 01.05.2004 r. system HACCP (4). Pierwsze zapisy o konieczności wdrażania systemu HACCP w dużych przedsiębiorstwach określono w ustawie o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia z 11.05.2001 r. (5). W trosce o dobro konsumenta producenci żywności wdrażają dobrowolne Systemy Zarządzania Bezpieczeństwem Żywności według normy ISO 22000:2005(2). Systemy zarządzania bezpieczeństwem produkowanej żywności powinny być opracowane w sposób zrozumiały dla wszystkich działających w łańcuchu żywnościowym. Powinny również udowadniać opinii publicznej, że posiadają przewidywalne środki kontroli gwarantujące bezpieczeństwo spożywanej przez konsumentów żywności. HACCP jako systemowe postępowanie mające na celu identyfikację i oszacowanie zagrożeń bezpieczeństwa żywności oraz ryzyka ich wystąpienia podczas produkcji i dystrybucji stanowi integralny element ISO 22000:2005. Standard ten wprowadził nowe elementy do zarządzania bezpieczeństwem żywności: programy wstępne, operacyjne programy wstępne, walida-

cję środków nadzoru lub ich kombinacji oraz interaktywną komunikację w łańcuchu żywnościowym (2, 22, 25).

Mikrobiologia prognostyczna

Narzędziem wspierającym działanie systemów zarządzania jakością jest mikrobiologia prognostyczna. Jest to dział mikrobiologii żywności wykorzystujący elementy matematyki w celu określania zachowania się mikroorganizmów (głównie chorobotwórczych) w produkowanej i dystrybuowanej żywności (13, 15, 16, 20). Mikrobiologia prognostyczna wykorzystuje zasadę, że reakcja grup mikroorganizmów w określonych warunkach w żywności jest powtarzalna. Warunki określone są przez takie czynniki, jak: czas i temperatura, pH, aktywność wody, zawartość różnych soli, kwasów organicznych oraz dostępność tlenu. Informacja dotycząca składu chemicznego, technologii produkcji i mikrobiologii produkowanej żywności pozwala na wybór możliwie bezpiecznego modelu prognostycznego, czyli takiego, który będzie prognozował wzrost drobnoustrojów w sposób najbardziej zbliżony do wzrostu w warunkach rzeczywistych (9, 17). Model matematyczny jest równaniem różniczkowym określającym wzrost, przeżywalność lub inaktywację mikroorganizmów w ściśle określonych warunkach w żywności. W celu wykorzystania modelu matematycznego do prognozowania i analizowania wzrostu niepożądanych mikroorganizmów, np. podczas produkcji żywności, należy wykonać szereg badań mikrobiologicznych na produkcie modelowym w warunkach eksperymentalnych, a następnie dokonać jego walidacji w oparciu o konkretny proces pro-

dukcji (6, 9, 22, 25). Wykorzystanie matematycznych modeli prognostycznych w systemach zarządzania bezpieczeństwem żywności (np. HACCP) jest jak najbardziej uzasadnione (1). Modele prognostyczne mogą mieć istotne zastosowanie podczas wdrażania systemu HACCP na co najmniej 3 etapach: przeprowadzenia analizy zagrożeń i określenia środków kontrolnych, ustalenia poziomów docelowych i limitów krytycznych dla każdego krytycznego punktu kontrolnego oraz podczas ustalania procedur weryfikacji. Dotychczasowe działania w zakresie zapewniania bezpieczeństwa żywności nie odnoszą się do kwestii zdrowia publicznego. System HACCP koncentruje się na zagrożeniach i warunkach, które mogą spowodować zagrożenia w czasie realizacji procesu technologicznego i w konsekwencji mogą wystąpić w gotowym produkcie. Brakuje powiązania między działaniami podejmowanymi przez przedsiębiorstwa, zajmujące się produkcją i obrotem żywnością, a odpowiednim poziomem ochrony zdrowia ludzi. Dlatego też w ostatnich latach wzrosło zainteresowanie narzędziami, które mogą połączyć wymagania w zakresie zapewnienia bezpieczeństwa żywności z jego oczekiwanym wpływem na zdrowie publiczne. Punktem wyjścia tej koncepcji jest zapewnienie odpowiedniego poziomu ochrony zdrowia ludzi wraz z ustanowieniem celów bezpieczeństwa żywności, odnoszących się do rodzaju żywności, rodzaju zagrożeń oraz częstotliwości ich występowania lub maksymalnej dopuszczalnej wielkości zagrożenia w gotowym przeznaczonym do konsumpcji produkcie. Ten przykład nie wyczerpuje możliwości aplikacyjnych mikrobiologii prognostycznej w systemach zarządzania bezpieczeństwem żywności. Warto również nadmienić, że FAO/WHO w 2002 r. podjęły decyzję o włączeniu zasad mikrobiologicznego zarządzania ryzykiem w rozwój standardów bezpieczeństwa żywności. Oznacza to, że wymagania ustawodawcze winny być uzasadnione na podstawie udokumentowanej analizy ryzyka i odnosić się do odpowiedniego poziomu ochrony ustalonego przez WTO. Ilościowa analiza ryzyka powinna być podstawą rozstrzygnięcia sporów w kwestiach dotyczących zagrożeń mikrobiologicznych w produkowanej żywności, skutków w przypadku zatrucia pokarmowych oraz umożliwić znalezienie i ustalenie przyczyn zaistniałych sytuacji. Analiza ilościowa to również jedno z możliwych do wykorzystania zastosowań mikrobiologii prognostycznej (11, 19, 22).

Bazy danych i modele

Rozwój technik komputerowych i internetu sprzyja powstawaniu baz danych dotyczących zachowania się głównych patogenów oraz drobnoustrojów odpowiedzialnych za rozkład żywności. Coraz większa liczba danych eksperymentalnych wykonanych na produktach modelowych z użyciem programów komputerowych (tzw. modeli trzeciorzędowych) stanowi źródło cennych informacji dla osób zajmujących się analizą ryzyka mikrobiologicznego na każdym etapie łańcucha żywnościowego. Analiza ryzyka to trzyczęściowy, ściśle ze sobą powiązany proces oceny ryzyka, zarządzania ryzykiem i informowania o ryzyku (3). Do znanych i często stosowanych programów prognozujących zachowanie się niepożądanych drobnoustrojów w symulowanych warunkach ma-

jących zastosowanie w analizie ryzyka mikrobiologicznego należy Pathogen Modeling Program 7.0 (PMP 7.0) dostępny pod adresem internetowym Departamentu Rolnictwa Stanów Zjednoczonych (USDA – United States Department of Agriculture) – www.arserrc.gov/mfs/PATHOGEN.HTM. Pakiet ten jest wersją niekomercyjną, od 17 lat systematycznie rozbudowywaną i zawierającą ponad 35 modeli dla 11 rodzajów bakterii patogennych. Oprogramowanie pozwala przewidywać wzrost lub inaktywację drobnoustrojów przy ustalonej temperaturze, pH, NaCl/a_w , zawartości kwasów organicznych, składzie atmosfery oraz azotynów w zmodyfikowanych pożywkach mikrobiologicznych (15, 20). Kolejnym przykładem programu do prognozowania wzrostu drobnoustrojów jest Growth Predictor (GP) dostępny w witrynie internetowej Instytutu Badań Żywności (IFR – Institute of Food Research) – www.ifr.ac.uk/Safety/GrowthPredictor/. Zawiera on 18 modeli wzrostu bakterii patogennych. W wyniku współpracy międzynarodowej pomiędzy Agencją Standaryzacji Żywności (FSA – Food Standards Agency), IFR, USDA oraz Australijskim Centrum Doskonałości Bezpieczeństwa Żywności (Australian Food Safety Centre of Excellence) powstała bezpłatna komputerowa baza danych ComBase (Common dataBase), dostępna „online” w internecie po uprzedniej rejestracji na stronie www.combase.cc. Inicjatywa powstania ComBase jako źródła wiedzy ułatwiającej współpracę międzynarodową w sferze nauki dotyczącej bezpieczeństwa mikrobiologicznego produkowanej żywności otrzymała poparcie Komisji Europejskiej. W bazie danych ComBase znajdują się 3 użyteczne narzędzia – Combase Browser, Combase Predictor oraz Combase DMFit. Witryna Combase Browser umożliwia użytkownikowi wyszukanie dostępnych w bazie wyników badań, po wcześniejszym zawężeniu wyszukiwania do określonego mikroorganizmu oraz warunków środowiska (np. temperatura, pH, aktywność wody i in.) (21). Baza danych ComBase stanowi cenne źródło wiedzy na temat bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności, zawiera już ponad 40 000 rekordów (tj. obserwacji opisujących reakcje bakterii na określone środowisko) i jest systematycznie rozbudowywana. ComBase Predictor jest narzędziem służącym prognozowaniu wzrostu najważniejszych patogenów żywności z uwzględnieniem takich czynników środowiska, jak: temperatura, pH i zawartość NaCl (18, 23). ComBase Predictor może być użyteczny jako narzędzie zapewniania bezpieczeństwa żywności, podczas opracowywania nowych technologii, w szkoleniach, badaniach naukowych, w oszacowywaniu ryzyka mikrobiologicznego, jak również podczas tworzenia przewodników i norm. Trzecim narzędziem wbudowanym w bazę danych ComBase jest ComBase DMFit. Jest to program pozwalający analizować wzrost drobnoustrojów na podstawie modelu Baranyi i Robertsa (7).

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} At - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{\mu_{\max} A(t)} - 1}{e^{m(y_{\max} - y_0)}} \right)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{v} \ln \left(\frac{e^{-vt} + q_0}{1 + q_0} \right)$$

gdzie:

$y(t) = \ln x(t)$; $x(t)$ – liczba komórek bakterii w czasie t ,

$y_0 = \ln x_0$; x_0 – początkowa liczba komórek bakterii,
 v – tempo powstawania limitującego substratu, $\approx \mu_{\max}$,
 t – czas (h),

m – parametr charakteryzujący przejście do fazy stacjonarnej,

q_0 – koncentracja limitującego substratu zmieniająca się w czasie.

Dzięki zastosowaniu ComBase DMFit otrzymuje się główne parametry charakteryzujące wzrost drobnoustrojów, czyli współczynnik tempa wzrostu (μ_{\max}) i czas trwania fazy spoczynkowej (lag fazy).

Zastosowanie mikrobiologii prognostycznej

Mikrobiologia prognostyczna z wykorzystaniem międzynarodowej bazy danych i dostępnych programów komputerowych może mieć wszechstronne zastosowanie w:

– systemach eksperckich do określania charakterystyki mikrobiologicznej, składu żywności oraz identyfikacji problemów, które mogą wystąpić w warunkach produkcyjnych,

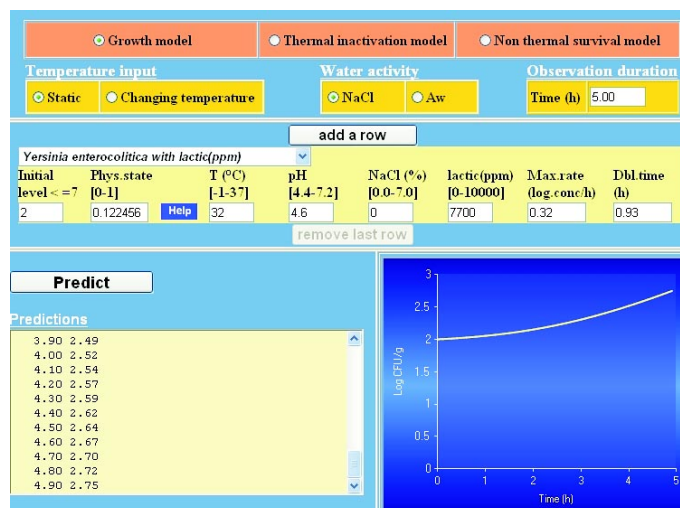
– systemie HACCP, do szacowania ryzyka oraz w analizie zagrożeń przy użyciu „drzewka decyzyjnego”,

– szybkim rozpowszechnianiu informacji dotyczących wybuchów epidemii poprzez stronę internetową oraz publikowanie pochodzących z wielu źródeł komentarzy dotyczących konsekwencji i incydentów związanych z chorobami odżywnościowymi,

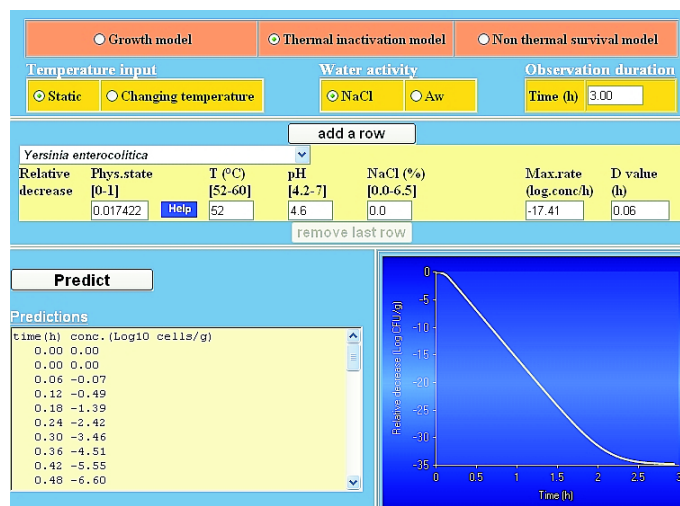
– zabezpieczeniu wysokiej jakości mikrobiologicznej,
 – edukacji (online) personelu w zakładach produkujących żywność (10, 21).

Przykładem wykorzystania bazy danych ComBase wraz z zawartym w niej oprogramowaniem do prognozowania mikrobiologicznego może być kilka elementów łańcucha produkcji serka twarogowego, niedojrzewającego, ziarnistego (typu cottage cheese) i natłuszczonego śmietanką. Z danych piśmiennictwa wynika, że obecność mikroorganizmów chorobotwórczych w tego typu serkach pochodzi z zanieczyszczeń wtórnych, których głównym źródłem jest personel, niska higiena produkcji oraz błędy technologiczne (8, 26). Duże zagrożenie w produkcji i dystrybucji cottage cheese może stanowić tlenowa Gram-ujemna pałeczka *Yersinia enterocolitica* (8, 26). Do oszacowania wzrostu lub inaktywacji tej bakterii w wybranym odcinku łańcucha produkcji zastosowano program ComBase Predictor. W programie konieczne jest wstawienie danych dotyczących głównych parametrów fizykochemicznych produktu i procesów podczas produkcji. Są to niezbędne informacje do przeprowadzenia symulacji wzrostu bakterii patogennych podczas etapów produkcji cottage cheese. W tym celu określono temperaturę i czas trwania analizowanych etapów produkcji oraz pH, zawartość NaCl i kwasu mlekowego (0,77% = 7700 ppm – jednostka [ppm] jest wymagana w programie) (24). Za poziom początkowy liczby *Y. enterocolitica* przyjęto 2 log jtk/g produktu. Poziom wyjściowy zanieczyszczenia bakterią *Y. enterocolitica* poprzedzającego procesu był poziom wejściowym (początkowym) kolejnego. W zaprezentowanym przykładowym opracowaniu rozpatrywano następujące etapy produkcji: 1) koagulacja mleka pasteryzowanego (czas koagulacji: 5 h, temperatura: 32°C, pH skrzepu: 4,6), 2) krojenie i dogrzewanie skrzepu (czas

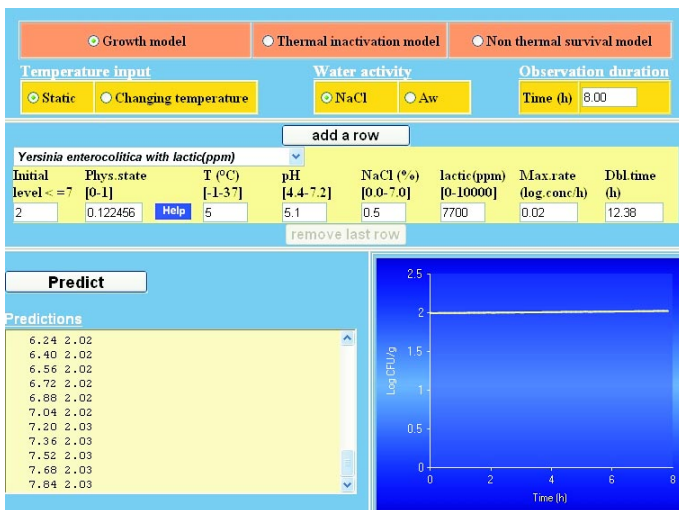
procesu: 3 h, temperatura: 52°C, pH: 4,6), 3) odwadnianie, chłodzenie, dodatek soli kuchennej, natłuszczenie śmietanką i pakowanie (czas procesu: 8 h, temperatura: 5°C, pH: 5,1, kwas mlekowy: 7700 ppm, NaCl: 0,5%) oraz 4) magazynowanie i dystrybucja (czas: 504 h, temp. 6°C, pH: 5,1, kwas mlekowy: 7700 ppm, NaCl: 0,5%) (24). Program ComBase Predictor uwzględnia również dane dotyczące stanu fizjologicznego (SF) bakterii, czyli sposobu, w jaki badany drobnoustrój reaguje na zmiany aktualnego środowiska, np. stres związany ze zmianą temperatury, pH czy ciśnienia osmotycznego (wartość SF = 0 – brak wzrostu, SF = 1 – rozwój optymalny). W opracowaniu zastosowano opcję domyślnego wyboru wartości SF, sugerowanej przez program. Po etapie koagulacji mleka na podstawie modelu wzrostu zawartego w programie ComBase Predictor nastąpił nieznaczny wzrost liczby komórek *Yersinia* do poziomu 2,75 log jtk/g (ryc. 1). Kolejny proces, którym jest krojenie i dogrzewanie, eliminuje analizowany gatunek bakterii w czasie 0,3 h (ryc. 2). W tym momencie produkt należy uznać za bezpieczny, lecz w przypadku, gdy dojdzie do wtórnego zanieczysz-



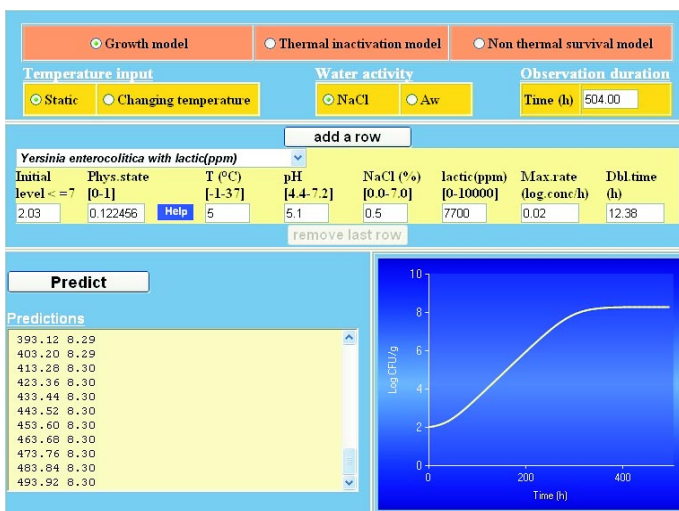
Ryc. 1. Prognoza zmiany liczby komórek *Y. enterocolitica* wg programu ComBase Predictor podczas pierwszego etapu produkcji serka cottage cheese



Ryc. 2. Prognoza zmiany liczby komórek *Y. enterocolitica* wg programu ComBase Predictor podczas drugiego etapu produkcji serka cottage cheese



Ryc. 3. Prognoza zmiany liczby komórek *Y. enterocolitica* wg programu ComBase Predictor podczas trzeciego etapu produkcji serka cottage cheese



Ryc. 4. Prognoza zmiany liczby komórek *Y. enterocolitica* wg programu ComBase Predictor podczas magazynowania i dystrybucji serka cottage cheese

czenia (na poziomie 2,0 log jtk/g) wzrost liczby komórek *Yersinia* będzie nieunikniony. Rozpatrując czas i warunki odwadniania, chłodzenia, dodatku NaCl oraz natłuszczenia i pakowania serka zaprognozowano nieznaczny wzrost liczby komórek *Y. enterocolitica*, których poziom 2,03 log jtk/g utrzymywał się do etapu magazynowania i dystrybucji (ryc. 3). Przy zachowanej ciągłości łańcucha chłodniczego i założeniu dwudziestojednodniowego terminu przydatności do spożycia nastąpił, wg prognozy ComBase Predictor, wzrost liczby komórek *Y. enterocolitica* do log 8,30 jtk/g produktu (ryc. 4). Minimalna dawka infekcyjna w przypadku tej bakterii wynosi ok. log 8-9 jtk/g, tak więc wyprodukowany serek stwarza potencjalne zagrożenie dla zdrowia człowieka.

Podsumowanie

Przytoczony w artykule hipotetyczny przykład oszacowania zagrożenia wzrostu bakterii *Y. enterocolitica* służy jedynie przedstawieniu jednej z możliwości prognostycznych zastosowań oprogramowań komputerowych. Dzięki nim można oszacować ryzyko mikrobiologiczne dla

całego łańcucha żywnościowego począwszy od produkcji mleka, a na konsumpcji produktów mleczarskich kończąc. W zaprezentowanym przykładzie nie uwzględniono interakcji wymienionego patogenu z drobnoustrojami występującymi w produkcji serka cottage cheese (np. hamującego wpływu bakterii fermentacji mlekowej). Dlatego należy założyć maksymalny wzrost bakterii, a przez to uzyskać najbardziej bezpieczną prognozę.

Piśmiennictwo

1. Anon.: CAC/RCP: Recommended International Code of Practice. General Principles of Food Hygiene. Annex on Hazard Analysis and Critical Control Point System and Guidelines for Its Application. CAC/RCP 2003, 1-1969, Rev. 4.
2. Anon.: PN-EN ISO 22000: 2006: Systemy zarządzania bezpieczeństwem żywności – Wymagania dla każdej organizacji należącej do łańcucha żywnościowego.
3. Anon.: Rozporządzenie (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności.
4. Anon.: Ustawa o bezpieczeństwie żywności i żywienia z dnia 25 sierpnia 2006 r., Dz. U. 2006 r. nr 171, poz. 1225.
5. Anon.: Ustawa o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia z 11 maja 2001 r., Dz. U. 2001 r. nr 63, poz. 634.
6. Baranyi J., Pin C., Ross T.: Validating and comparing predictive models. Int J. Food Microbiol. 1999, 48, 159-166.
7. Baranyi J., Roberts T. A.: Mathematics of predictive food microbiology. Int J. Food Microbiol. 1995, 26, 199-218.
8. Bozkurt H., Erkmen O.: Predictive modeling of *Yersinia enterocolitica* inactivation in Turkish Feta cheese during storage. J. Food Eng. 2001, 47, 81-87.
9. Giffel M. C., Zwietering M. H.: Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 1999, 46, 135-149.
10. Godlewska K., Kolożyn-Krajewska D.: Prognozowanie mikrobiologiczne w łańcuchu żywnościowym. Przemysł Spoż. 2008, 2, 16-19.
11. Gorris L. G. M.: Food safety objective: An integral part of food chain management. Food Control 2005, 16, 801-809.
12. Hadryjańska B., Górna J.: System zarządzania jakością wg normy ISO 9001:2000 oraz system HACCP. Przegl. Mlecz. 2008, 4, 4-10.
13. Kajak K.: Zasady prognozowania w mikrobiologii żywności. Żywność Nauka Technologia Jakość 2001, (27), 81-93.
14. Kolożyn-Krajewska D., Jalościńska-Pieńkowska M.: Prognozowanie mikrobiologiczne jako narzędzie kształtowania bezpieczeństwa żywności. Przemysł Spoż. 2003, 2, 32-34, 48.
15. Kowalik J., Ziajka S.: Ocena wzrostu *Listeria monocytogenes* w mleku na podstawie programu PMP 7.0 oraz badań własnych. Medycyna Wet. 2005, 61, 940-942.
16. Łobacz A., Kowalik J., Ziajka S., Kopeć M.: Porównanie i walidacja prognozowanego i obserwowanego tempa wzrostu *Listeria monocytogenes* w mleku pasteryzowanym i UHT. Medycyna Wet. 2008, 64, 80-84.
17. Łobacz A., Ziajka S., Kowalik J.: Predictive microbiology – tool for quantitative microbiological risk assessment. Pol. J. Food Nutr. Sci. 2007, 57, 365-370.
18. Marc Y. Le, Pin C., Baranyi J.: Methods to determine the growth domain in a multidimensional environmental space. Int. J. Food Microbiol. 2005, 100, 3-12.
19. Mayes T.: Risk analysis in HACCP: burden or benefit? Food Control 1998, 9, 171-176.
20. McKellar R. C., Lu X. W.: Modeling microbial responses in foods. CRC Press LLC, Florida 2004.
21. McMeekin T. A., Baranyi J., Bowman J., Dalgaard P., Kirk M., Ross T., Schmid S., Zwietering M. H.: Information systems in food safety management. Int. J. Food Microbiol. 2006, 112, 181-194.
22. McMeekin T. A., Ross T.: Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. Int. J. Food Microbiol. 2002, 78, 133-153.
23. Roupas P.: Predictive modeling of dairy manufacturing processes. Int. Dairy Journal 2008, 18, 741-753.
24. Rymaszewski J., Śmietana Z.: Sery dojrzewające i sery twarogowe, [w:] Ziajka S. (red.): Mleczarstwo T. 2. Wyd. ART, Olsztyn 1997.
25. Scott V. N.: How does industry validate elements of HACCP plans? Food Control 2005, 16, 497-503.
26. Usajewicz I.: Mikrobiologia mleka i jego przetworów, [w:] Ziajka S. (red.): Mleczarstwo T. 1. Wyd. UWM, Olsztyn 2008.

Adres autora: dr inż. Jarosław Kowalik, ul. Oczapowskiego 7, 10-719 Olsztyn; e-mail: j.kowalik@uwm.edu.pl