

KVANTITATÍVNA POTRAVINÁRSKA MIKROBIOLÓGIA A JEJ VYUŽITIE V POTRAVINÁRSKEJ PRAXI QUANTITATIVE FOOD MICROBIOLOGY AND ITS APPLICATION IN FOOD PRACTICE

E. Valík, D. Liptáková, B. Bajúsová

Abstract: Predictive microbiology plays the most important role within the concept of quantitative food microbiology dealing with quantitative description of microbial growth in food. Predictive microbiology of use specific data to predict growth, decline or survival of microorganisms involved in food safety or spoilage problems. Both subjects, quantitative food microbiology and predictive microbiology, include useful tools for conducting the microbiological studies in terms to give the evidence of the compliance with the criteria throughout the shelf-life of foods. Mathematical models and database can provide us the first view into microbial behaviour in foods under specific conditions. Progress in predictive microbiology referring to accuracy of the predictions is tremendous nowadays. New databases and research tools based on various mathematical models can be used in food evaluation and design processes thus also supporting the new wind in food legislation.

Kľúčové slová: kvantitatívna potravinárska mikrobiológia, prediktívna mikrobiológia, rast mikroorganizmov

Európski potravinárski a legislatívni odborníci nám v predchádzajúcich rokoch v oblasti hygieny pripravili nové nariadenia ES počnúc Nariadením Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002, ktorým sa ustanovili všeobecné zásady a požiadavky potravinového práva a zriadil sa Európsky úrad pre bezpečnosť potravín. Ďalej nasledovali Nariadenia Komisie ES č. 852/2004, 853/2004, 854/2004, 882/2004 a Nariadenie Komisie (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériách pre potraviny tento tzv. hygienický balík „pravdepodobne“ uzatvára. Jedným z hlavných podnetov pre zmeny v potravinárskej hygienickej legislatíve bol nové vedecké a epidemiologické prístupy, poznatky a údaje, snaha o preventívne, systémové a procesné riešenie výroby hygienicky bezchybných a zdravotne neškodných potravín v praxi. Samotná potravinárska skúsenosť už tiež postupne dokazovala, že klasický kontrolný prístup v zmysle vyšetovania finálnych výrobkov nie je pre bezpečnosť potravín dostatočný. Zvlášť sa to prejavovalo pri vyšetovaní a hodnotení mikrobiologickej akosti potravín. Mikroorganizmy, ktoré podľa Nariadenia ES č. 2073/2005 tvoria hlavný zdroj ochorení z potravín u ľudí, sú schopné dynamicky reagovať alebo prispôsobiť sa na zmeny vonkajšieho a vnútorného prostredia potravín, na zmeny technologických procesov. (V globálnom meradle sa mikroorganizmy ľahko prispôbujú zmeneným produkčným, spracovateľským, stravovacím a civilizačným podmienkam, čoho dôsledkom je vysoký počet ochorení z potravín a výskyt tzv. nových mikrobiálnych agens (WHO, 2001)).

Dôležité pre výrobcov potravín však je, že potreba poznať a kvantitatívne definovať správanie sa mikroorganizmov počas doby spotreby je zreteľne zakotvená v nariadení ES 2073/2005. Prevádzkovatelia potravinárskych podnikov by mali podľa tohto nariadenia vykonávať štúdie, ktoré sú uvedené v prílohe II, s cieľom prešetriť dodržiavanie mikrobiologických kritérií počas celej uchovateľnosti produktu. Ide o štúdie

- zamerané na špecifikácie fyzikálnych a chemických vlastností produktu označovaných aj ako vnútorné faktory potravín (Görner a Valík, 2004),

- hodnotiace štúdie využívajúce matematické modelovanie a predikcie rastu a prežívania relevantných mikroorganizmov,
- skladovacie testy za štandardných/zmenených distribučných/skladovacích podmienok, prípadne podmienok konzumácie
- a tzv. záťažové testy s nadmernou umelou kontamináciou, anglicky nazývané „challenge tests“.

Horeuvedené testy sú neoddeliteľnou súčasťou konceptu kvantitatívnej potravinárskej mikrobiológie, v ktorej z hľadiska používaných metód má nezastupiteľné miesto matematické modelovanie a prediktívny prístup k riešeniu špecifického problému.

Prediktívna mikrobiológia, ako súčasť kvantitatívnej potravinárskej mikrobiológie je založená na predpoklade, že odozvy populácií mikroorganizmov na faktory vnútorného a vonkajšieho prostredia sú reprodukovateľné (Ross a McMeekin, 1994). Cieľom matematického modelovania správania sa mikroorganizmov v modelovom prostredí je predpovedať a zhodnotiť bezpečnosť a trvanlivosť potravín ako aj zistiť, za aký čas vybrané ukazovatele akosti prekročia hygienické limity (Valík a Görner, 1995, 1996; Valík, 1997; Pin a Baranyi, 1998; Soboleva, 2000;). V praxi je tiež možné definovať maximálne limity pre kontamináciu potravín počas výroby tak, aby sa na konci doby spotreby neprekročili oficiálne hygienické alebo vlastné limity, a to aj pri kolísajúcej mikrobiálnej záťaži alebo meniacich sa faktorov prostredia (Valík, Greifová a Görner, 2001).

Rast mikroorganizmov je vo všeobecnosti zákonitý proces. Pre jeho kvantitatívne hodnotenie má nezastupiteľné postavenie rastová čiara, ktorá semilogaritmicky znázorňuje tento zákonitý proces a poskytuje niekoľko dôležitých rastových parametrov. Rastová čiara má väčšinou sigmoidný tvar so zreteľne odlišiteľnými hlavnými fázami: lag-fázou, exponenciálnou, stacionárnou a fázou odumierania.

Trvanie lag-fázy je určované množstvom práce, ktorú musia bunky vykonať, aby sa prispôbili novým podmienkam v prostredí (zmena teploty, pH, aktivity vody, obsahu živín a prítomných konzervačných látok) a rýchlosťou s akou túto prácu dokážu zvládnuť. Dôležitú úlohu pritom zohrávajú aj vlastnosti a fyziologický stav mikrobiálnych buniek (Buchanan a Cygnarowicz, 1990; Dufrenne a kol., 1997; Robinson a kol., 1998; Smelt, Otten a Bos, 2002).

Rastová rýchlosť je prvou deriváciou funkcie podľa času a je priamo úmerná koncentrácii buniek N :

$$\frac{dN}{dt} = \mu \times N \quad (1)$$

Rastová rýchlosť mikrobiálnej populácie závisí od mnohých činiteľov prostredia a genetických faktorov (Wijtzes a kol., 1998; Bednář a kol., 1999). Rastová rýchlosť prepočítaná na jednotku mikrobiálnej populácie sa nazýva špecifická rastová rýchlosť:

$$\mu = \frac{dN}{dt} \times \frac{1}{N} \quad (2)$$

Špecifická rastová rýchlosť μ sa udáva v h^{-1} a ako s definície (2) vyplýva, môže sa pohybovať v intervale hodnôt 0,0 až 1,0.

Modely prediktívnej potravinárskej mikrobiológie možno v súčasnosti klasifikovať na primárne, sekundárne a terciárne. Primárne modely popisujú priebeh rastovej čiary (Whiting a Buchanan, 1994; Schaffner a kol., 1997; Zwietering, 2002). Medzi najznámejšie primárne modely patria Gompertzova funkcia a Baranyiho dynamický

model (Baranyi a kol., 1993), ktorý v zjednodušenom tvare reprezentuje nasledovná rovnica

$$\frac{dN}{dt} = \alpha(t) \times \mu(N) \times N \quad (3),$$

v ktorej μ = špecifická rastová rýchlosť, N = počet mikroorganizmov a funkcia $\alpha(t)$ charakterizuje prispôbenie sa mikrobiálne bunky novému prostrediu počas lag-fázy.

Sekundárne modely definujú vzťahy rastových parametrov vyvolané faktormi prostredia potravín, ako sú napríklad, teplota (T), hodnota pH, hodnota a_w , prítomnosť inhibične pôsobiacich látok a pod. (Whiting a Buchanan, 1994; Schaffner a kol., 1997; McMeekin a kol., 2002; Zwietering, 2002). Najznámejšími sekundárnymi modelmi sú Arrheniova rovnica a tzv. odmocninový model podľa Ratkowského. Prvý z nich vychádza zo všeobecného predpokladu, že vzťah medzi reakčnou rýchlosťou a teplotou je lineárny. Arrheniova rovnica je vhodná pre modelovanie rastovej rýchlosti mikroorganizmov pri suboptimálnych až optimálnych teplotách rastu (Skinner a kol., 1994; Schaffner a kol., 1997; McDonald, 1999):

$$k = A \times e^{\frac{-E}{R \times T}} \quad (4),$$

(k = rýchlostná konštanta, A = konštanta, R = univerzálna plynová konštanta, T = absolútna teplota, E = aktivačná energia). Druhý model popisuje rastovú rýchlosť vo vzťahu k teplote rovnicou:

$$\sqrt{k} = b \times (T - T_{\min}) \quad (5),$$

v ktorej b = regresný koeficient, T_{\min} = potenciálna minimálna teplota rastu, keď $k = 0$, k = rastová rýchlosť, T = teplota (Ratkowsky, 1984).

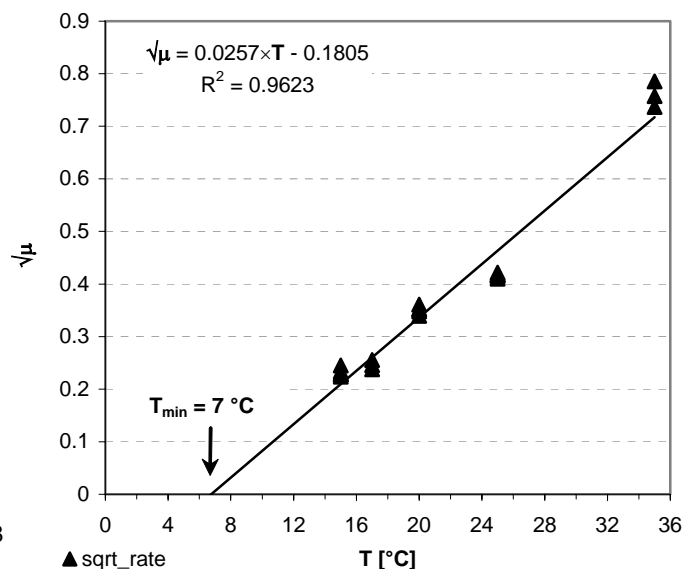
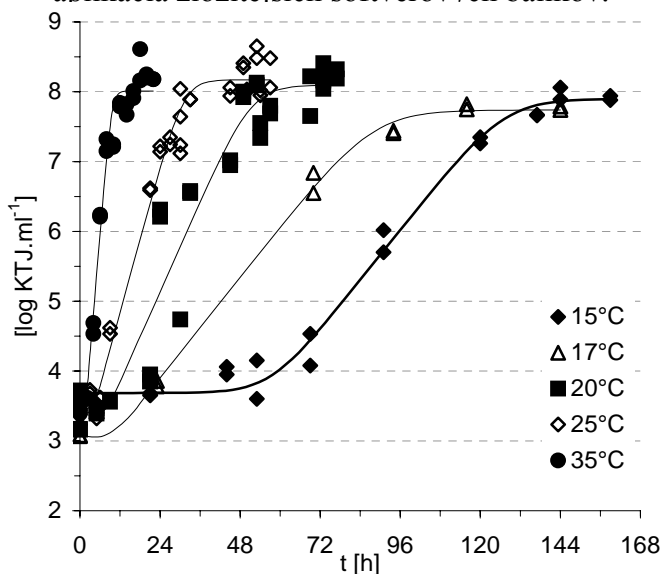
Ross a McMeekin (1994) do Ratkowského modelu zahrnuli aj ostatné faktory prostredia, pH a aktivitu vody. Výsledkom sú experimentálne overené vzťahy:

$$\sqrt{k} = b \times (T - T_{\min}) \times \sqrt{a_v - a_{v_{\min}}}, \text{ McMeekin (1987),}$$

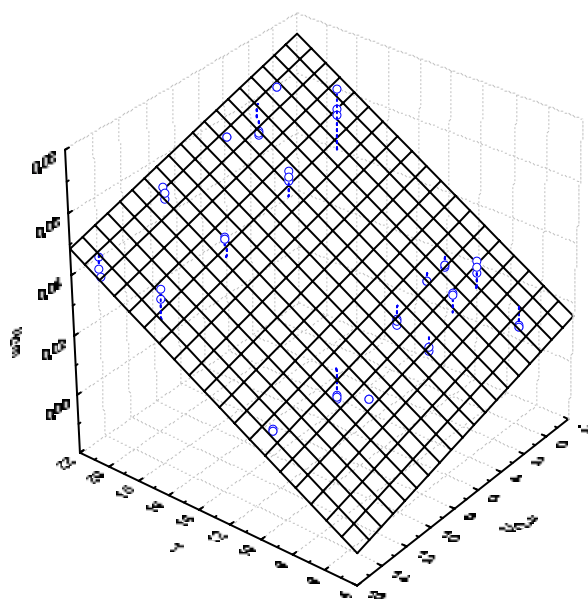
$$\sqrt{k} = b \times (T - T_{\min}) \times \sqrt{pH - pH_{\min}}, \text{ Adams a kol., (1991),}$$

$$\sqrt{k} = b \times (T - T_{\min}) \times \sqrt{a_v - a_{v_{\min}}} \times \sqrt{pH - pH_{\min}}, \text{ McMeekin a kol., (1992).}$$

Ďalšími možnosťami sekundárneho modelovania sú priestorové 3D zobrazenia odozviev rastu mikroorganizmov na viac faktorov prostredia potravín, ktoré umožňuje aplikácia zložitejších softvérových balíkov.



znázornené Baranyiho modelom (3), závislosť rastovej rýchlosti *S. aureus* od teploty inkubácie reprezentuje Ratkovského model (5).



$$\mu = 0.000073 + 0.0032 \cdot T - 0.00137 \cdot V_0$$

Obr. 3: Závislosť rastovej rýchlosti *Candida maltosa* v mlieku od teploty inkubácie a objemu inokula 18h kultúry *L. rhamnosus*

Terciárne modely navzájom spájajú primárne a sekundárne modely do aplikačných programov, databáz alebo expertných systémov. Patria k nim napríklad Pathogen Modelling Program, ComBase, Food Micromodel, Seafood Spoilage Predictor a iné (Baranyi a Valík, 2003). Terciárne modely sprístupňujú výsledky a možnosti aplikácie prediktívnej mikrobiológie pre všetky oblasti potravinárskeho priemyslu a výskumu (Valík, 1997; McDonald, 1999).

K rozvoju kvantitatívnej potravinárskej a prediktívnej mikrobiológie na Slovensku prispeli, okrem iných, aj práce týkajúce sa dynamiky stafylokokov pri fermentácii kyslomliečnych produktov (Görner a Šimkovicová, 1979), termorezistentných vláknitých húb (Valík, Baranyi a Görner, 1999, Valík, Piecková, 2000 a 2001) ako aj kontaminačných kvasiniek, či už v pekárenských alebo mliečnych produktoch (Valík a kol., 2002; Lauková a kol., 2002a, 2002b). Ďalšie práce v tejto oblasti boli zamerané na rast choroboplodných baktérií v potravinách alebo v modelových pokusoch, ako napríklad *Bacillus cereus* (Valík a kol., 2005), *Listeria monocytogenes* (Petríková a kol., 2004) alebo *Staphylococcus aureus* (Valík a Sonnenfeld, 2005 a Bajúsová a kol. 2006).

LITERATÚRA

1. ADAMS, M.R. - LITTLE, C.L. - EASTER, M.C.: Modelling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. Journal of Applied Bakteriology, 71, 1991, s. 65-71.
2. BAJÚSOVÁ, B. - VALÍK, E. - LIPTÁKOVÁ, D. - MEDVEĎOVÁ, A.: Rastové parametre kmeňov *Staphylococcus aureus* izolovaných z ovčieho mlieka a hrudkového syra. Seminár Mléko a Sýry 2006, Praha, 2006, v tlači.
3. BARANYI, J. - ROBERTS, T.A. - McCLURE, P.: A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. Food Mikrobiology, 10, 1993, s. 43-59.

4. BEDNÁŘ, M. - FRAŇKOVÁ, V. - SCHINDLER, J. - SOUČEK, A. - VÁVRA, J.: Lékařská mikrobiologie. Praha, Marvil, 1998, 558 s.
5. DUFRENNE, J. - DELFGOU, E. - RITMEESTER, W. - NOTERMANS, S.: The effect of previous growth conditions on the lag phase time of some foodborne pathogenic microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 34, 1997, s. 89-94.
6. GÖRNER, F. - VALÍK, E.: Aplikovaná mikrobiológia požívateľov. Malé Centrum, Bratislava, 2004, 528 s.
7. LAUKOVÁ, D. - VALÍK, E. - GÖRNER, F. - SCHMIDT, Š.: Termorezistencia vegetatívnych buniek kvasinky *Candida maltosa*. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 41, 2002b, č. 3, s. 169-178.
8. LAUKOVÁ, D. - VALÍK, E. - GÖRNER, F. - SCHMIDT, Š.: Vplyv kyseliny mliečnej na rast kvasinky *Candida maltosa*. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 41, 2002a, č. 2, s. 131-143.
9. MCDONALD, K. - SUN, D.W.: Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 52, 1999, s. 1-27.
10. McMEEKIN, T.A. - CHANDLER, R.E. - DOE, P.E. - GARLAND, C.D. - OLLEY, J. - PUTRO, S. - RATKOWSKY, D.A.: Model for the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosum*. *Journal of Applied Bacteriology*, 62, 1987, s. 543-550.
11. McMEEKIN, T.A. - OLLEY, J. - RATKOWSKY, D.A. - ROSS, T.: Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 2002, s. 395-407.
12. McMEEKIN, T.A. - ROSS, T. - OLLEY, J.: Application of predictive microbiology to assure the quality and safety of fish and fisheries products. *International Journal of Food Microbiology*, 15, 1992, s. 13-32.
13. PETRÍKOVÁ, J. - VALÍK, E. - LAUKOVÁ, D.: Kvantitatívna analýza vplyvu *Lactobacillus rhamnosus* VT1 na dynamiku rastu *Listeria monocytogenes*. 23. Kongres Československé spoločnosti mikrobiologické, Brno, 6.-9. 9. 2004. In: Abstrakty. *Bulletin ČSSM, Praha – Bratislava*, 45, 2004, s.89.
14. PIN, C. - BARANYI, J.: Predictive models as means to quantify the interactions of spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 1999, s. 59-72.
15. RATKOWSKY, D.A. - OLLEY, J. - McMEEKIN, T.A. - BALL, A.: Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology*, 149, 1984, s. 1-5.
16. ROBINSON, T.P. - OCIO, M.J. - KALOTI, A. - MACKAY, B.M.: The effect of growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 1998, s. 83-92.
17. ROSS, T. - McMEEKIN, T.A.: Predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 1994, s. 241-264.
18. SCHAFFNER, D.W. - LABUZA, T.P.: Predictive microbiology: where are we, and where are we going? *Food Technology*, 51, 1997, s. 95-99.
19. SKINNER, G.E. - LARKIN, J.W. - RHODEHAMEL, E.J.: Mathematical modelling of microbial growth. *Journal of Food Safety*, 14, 1994, s. 175-217.
20. SMELT, P.P.M. - OTTEN, G.D. - BOS, A.P.: Modelling the effect of sublethal injury on the distribution of the lag times of individual cells of *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 2002, s. 207-212.
21. SOBOLEVA, T.K. - PLEASANT, A.B. - LEROUX, G.: Predictive microbiology and food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 57, 2000, s. 183-192.
22. VALÍK, E. - SONNEVELD, C.: Hygiene and microbiological aspects of artisanal ewe's lump cheese production. Zborník prednášok z medzinárodnej stredoeurópskej vedeckej konferencie „Ekologické a ekonomické aspekty využitia poľnohospodársky znevýhodnených plôch chovom malých prežúvavcov“, Vrátna dolina, 18.-20. 10. 2005, s. 101-104.
23. VALÍK, E. - BARANYI, J. - GÖRNER, F.: Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 1999, s.141-146.
24. VALÍK, E. - LIPTÁKOVÁ, D. - POLKA, P. - KOREŇOVÁ, J. - PETRÍKOVÁ, J. - GÖRNER, F.: Mikrobiálne hodnotenie rizika: expozícia *Bacillus cereus* pri konzumácii pasterizovaného mlieka. In: Zborník prednášok zo 7. zjazdu SSPLPV pri SAV, Potravinárska sekcia. Slovenská spoločnosť pre poľnohospodárske, lesnícke, potravinárske a veterinárske vedy pri SAV v Bratislave, FCHPT STU Bratislava, 2005, s. 38-43.
25. VALÍK, E. - PIECKOVÁ, E.: Growth modelling of heat resistant fungi: the effect of water activity. *International Journal of Food Microbiology*, 63 (1-2), 2001, pp.11-17.
26. VALÍK, E. - PIECKOVÁ, E.: Parametre charakterizujúce rast *Talaromyces avellaneus* vo vzťahu k aktivite vody. *Czech J. Food. Sci.*, 18(6), 2000, s.219-223.
27. VALÍK, E. - GÖRNER, F. - HOZOVÁ, B.: Obsah kvasiniek v plnenom pečive typu croissant vo vzťahu k dynamike aktivity vody. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 41, 2002, č. 2, s. 123-130.
28. VALÍK, E. - GÖRNER, F.: Predpovedná mikrobiológia. *Bulletin PV*, 34 (3-4), 1995, s.123-134.
29. VALÍK, E. - GÖRNER, F.: Prognostické aspekty v potravinárskej mikrobiológii. *Potrav. Vědy*, 14, 1996, s.261-273.
30. VALÍK, E., GREIFOVÁ, M., GÖRNER, F.: Growth prediction of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. In: 3rd International Conference on Predictive Microbiology, Ed.: J.F.M. Van Impe, Katholieke Universiteit Leuven, 2001, p.311-313. BUCHANAN, R.L. - CYGNAROWICZ, M.L.: A mathematical approach toward defining and calculating the duration of the lag phase. *Food Microbiology*, 7, 1990, s. 237-240.

31. VALÍK, L.: Predikcia v potravinárskej mikrobiológii. Súčasný pohľad na problematiku a postrehy zo študijného pobytu na Institute of Food Research v Readingu. Bulletin PV, 36 (4), 1997, s.225-236.
32. WHITING, R.C. - BUCHANAN, R.L.: Microbial modelling. Food Technology, 48, 1994, s. 113-120.
33. WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne infections and Intoxications in Europe. Seventh Report 1993-1998. Ed.: K. Schmidt, C. Tirado. Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine, Berlin, 2001, 482 s.
34. WIJZES, T. - VAN'T RIET, K. - HUIS IN'T VELD, J.H.J. - ZWIETERING, M.H.: A decision support system for the prediction of microbial food safety and food quality. International Journal of Food Mikrobiology, 42, 1998, s. 79-90.
35. ZWIETERING, M.: Quantification of microbial quality and safety in minimally processed foods. International Dairy Journal, 12, 2002, s. 263-271.

Kontaktná adresa:

Doc. Ing. Ľubomír Valík PhD., Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, STU v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.