

ELŻBIETA ROSIAK, DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA

## ZASTOSOWANIE METOD PROGNOZOWANIA MIKROBIOLOGICZNEGO DO OKREŚLANIA ROZWOJU MIKROFLORY SAPROFITYCZNEJ W PRODUKTACH MIĘSNYCH UTRWALONYCH LIZOZYMEM W FORMIE MONOMERU

### Streszczenie

Celem pracy było opracowanie matematycznych modeli wzrostu ogólnej liczby drobnoustrojów oraz saprofitycznych bakterii z rodzaju *Pseudomonas spp.* w modelowych produktach mięsnych utrwalonych lizozymem w formie monomeru. Badania mikrobiologiczne wykonano klasycznymi metodami płytkowymi. Do uzyskanych danych empirycznych dopasowano funkcje s-kształtne (Gomperta i logistyczną) oraz funkcje wielomianowe stopnia drugiego i trzeciego. Szacowania parametrów funkcji pierwszorzędowych dokonano z wykorzystaniem procedur iteracyjnych, wyznaczających najmniejszą wartość sumy kwadratów różnicy błędu pomiędzy wartościami empirycznymi i teoretycznymi. Szacowania parametrów modeli zbiorczych dokonano klasyczną metodą najmniejszych kwadratów. Na podstawie modeli pierwszorzędowych uzyskano parametry kinetyczne opisujące rozwój badanych grup drobnoustrojów. Modele zbiorcze pozwoliły określić wpływ badanych czynników środowiskowych na populację drobnoustrojów.

**Słowa kluczowe:** żywność, mikrobiologia, prognozowanie, produkty mięsne.

### Wstęp

Analizy mikrobiologiczne żywności prowadzone metodami tradycyjnymi są pracochłonne i czasochłonne, prowadzą one do opóźnienia dystrybucji żywności czego skutkiem mogą być straty przedsiębiorstwa. Alternatywę stanowią szybkie testy diagnostyczne oparte o techniki immunoenzymatyczne i genetyczne oraz pozwalające stwierdzić obecność patogenu w próbie żywności. Mikrobiologia prognostyczna stanowi narzędzie wykorzystywane w systemach zapewniania jakości i bezpieczeństwa żywności [12, 19]. Prowadzone w wielu krajach badania obejmują wpływ czynników środowi-

ska (pH,  $a_w$ , dodatek substancji konserwujących,  $\text{NaNO}_2$ ) na wzrost i przeżywalność wybranych grup bakterii. Wykorzystywane w prognozowaniu mikrobiologicznym techniki są coraz bardziej złożone i precyzyjne dzięki dokonującemu się postępowi techniki i programów komputerowych oraz pakietów statystycznych.

Podjęte badania stanowią kontynuację prac prowadzonych w zakresie prognozowania mikrobiologicznego, w Zakładzie Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności Wydziału Nauk o Żywnieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW. W dotychczasowych badaniach [10, 13] opracowano modele rozwoju i inaktywacji różnych grup bakterii, w tym patogennych, w produktach z mięsa mielonego typu „meat ball”.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu substancji konserwującej – lizozymu na rozwój bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, występujących naturalnie oraz dodanych w postaci inokulum *Pseudomonas fluorescens* do produktów mięsnych.

## Material i metody badań

Material do badań były kulki mięsne przygotowane z rozdrobnionego mięsa wołowego z udźca z dodatkiem bułki tartej, mleka UHT o zawartości 2% tłuszczu, cebuli rozdrobnionej (każdy z dodatków w ilości 10% masy mięsa), soli (w ilości 1,2% masy mięsa). Surowce pochodziły z warszawskich placówek handlowych. Modelowy produkt mięsny, reprezentujący grupę produktów z mięsa rozdrobnionego, wykonano w warunkach laboratoryjnych.

Mięso, po usunięciu tkanki łącznej i nadmiaru tłuszczu, mielono w wyjałowionym gorącym powietrzem wilku laboratoryjnym. Do masy mięsnej dodawano pozostałe składniki i dokładnie mieszano. Następnie formowano kulki mięsne o masie  $100 \pm 3$  g, umieszczano w blaszkach i pieczono w piekarniku elektrycznym, w temp.  $150^\circ\text{C}$ , do momentu osiągnięcia wewnątrz produktu temp.  $70^\circ\text{C}$  (termopara Czaki Thermo-Product, typ EMT-302). Po zakończeniu obróbki cieplnej blaszki z gotowym produktem owijano folią aluminiową w celu uniknięcia zakażenia wtórnego i pozostawiano w temp.  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  do schłodzenia. Następnie produkty pakowano w torebki polietylenowe (o grubości 0,66 mm, przepuszczalne dla pary wodnej –  $8,96 \pm 0,28$  g/m<sup>2</sup>/24 h, przepuszczalne dla tlenu – 888 cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>/24 h), zamykano przez zgrzewanie i przechowywano w inkubatorach z dochlądaniem przez 16 dni, w temp. 10 i  $20^\circ\text{C}$ . Wykonano po 12 powtórzeń produkcyjno-przechowalniczych modelowych produktów mięsnych, przeznaczonych do badań w obu zakresach temperatury.

Do badań wykorzystano lizozym w postaci proszku, pochodzący z Katedry Technologii Produktów Drobiarskich Akademii Rolniczej w Poznaniu. Lizozym otrzymano metodą chromatografii jonowymiennej. Preparat przechowywano w temp.  $-18^\circ\text{C}$ .

Do gotowego produktu mięsnego dodawano lizozym w stężeniu 155,2 mg preparatu na 100 g mięsa, aby osiągnąć aktywność całkowitą enzymu w próbie na poziomie

25 000 jednostek aktywności U na 1 g mięsa. Na powierzchni produktu jałową bagietką wykonywano otwory, do których wprowadzano zawiesinę lizozymu w jałowej wodzie peptonowej. Równocześnie prowadzono próbę kontrolną – bez lizozymu.

Przeprowadzone badania dotyczyły określenia wpływu formy monomerycznej enzymu na rozwój ogólnej liczby bakterii (OLD), bakterii z rodzaju *Pseudomonas* występujących jako naturalna mikroflora (LBLPs) oraz bakterii *Pseudomonas fluorescens* dodanych w postaci inokulum do produktów mięsnych (LBPs<sup>1</sup>).

Jako substancja konserwująca może być stosowany lizozym. Aktywność antymikrobiologiczna lizozymu warunkowana jest jego odmianą konformacyjną. Enzym w postaci monomerycznej wykazuje ograniczone oddziaływanie na bakterie G(–) ze względu na obecność zewnętrznej błony cytoplazmatycznej zbudowanej z lipopeptydów, lipoprotein i liposacharydów oraz mniejszy udział peptydoglikanu w błonie komórkowej (5–10%). Podatność bakterii G(–) na lizozym jest większa w przypadku równoczesnego zastosowania czynników uszkadzających błonę komórkową (antybiotyki, chelatory wapnia i magnezu, aminoglikozydazy uszkadzające liposacharydy) [5, 6, 7, 9, 16, 20]. Na podstawie badań spektrofotometrycznych bakterie podzielono na trzy grupy w zależności od ich wrażliwości na działanie lizozymu. Do pierwszej najbardziej wrażliwej grupy zaliczono: *Salmonella*, *Brucella*, do drugiej *Klebsiella*, *Shigella*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Pasteurella*, *Erwinia*, *Escherichia*. Najbardziej odporne były *Vibrio*, *Proteus* oraz według niektórych autorów również *Pseudomonas* [11].

Do zakażenia produktów mięsnych zastosowano czystą kulturę *Pseudomonas fluorescens* (0887). Szczep zakupiono w Kolekcji Czystych Kultur (Łock 105) Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydziału Chemii Spożywczej i Biotechnologii Politechniki Łódzkiej. Został on wyizolowany z żywności pochodzenia mięsnego. W trakcie badań szczep przechowywano w temp. 6°C na skosach agarowych, a ożywiano na bulionie odżywczym (Noack Polen) w temp. 22°C. Oczko ezy *Pseudomonas fluorescens* posiewano na bulion odżywczy. Po 24 h inkubacji w temp. 22°C otrzymano wyjściową zawiesinę bakterii, którą rozcieńczano 7-krotnie w celu uzyskania gęstości inokulum 8–9·10<sup>1</sup>/ml. Do szczepienia gotowych produktów mięsnych zastosowano 1 ml inokulum/100 g produktu.

Ogólną liczbę drobnoustrojów (OLD) w jtk/g oznaczano na agarze odżywczym (Noack Polen) wg PN-A-82055-6:1994 [17] oraz instrukcji przygotowania podłoża firmy Noack Polen. Homogenizacji poddawano cały produkt (100 ± 3 g) w stosunku 1:1 z jałową wodą peptonową. Posiew wykonywano metodą wgłębną; temp. inkubacji 37°C, czas inkubacji 48 h. Do liczenia wybierano płytki zawierające od 15 do 300 kolonii.

Liczbę bakterii z rodzaju *Pseudomonas* (LBPs) oznaczano na agarze z dodatkiem selektywnego, liofilizowanego suplementu (cetrimid – czwartorzędowa sól amonowa; fucidyna, cefalosporyna – antybiotyki) – CFC, 5 ml/500 ml jałowego podłoża, firmy

Noack Polen wg normy PN-ISO 13720:1999 [18] oraz instrukcji przygotowania podłoża wymienionej firmy. Homogenizacji poddawano cały produkt ( $100 \pm 3$  g) w stosunku 1:1 z jałową wodą peptonową. Posiew wykonywano metodą wgłębną, temp. inkubacji  $22^{\circ}\text{C}$ , czas inkubacji 72 h. Do liczenia wybierano płytki zawierające od 15 do 300 kolonii.

Do opracowania pierwszorzędowych modeli matematycznych zastosowano czteroparametrowe funkcje sigmoidalne Gomperta i logistyczną [3, 21, 22]. Szacowania parametrów dokonano z wykorzystaniem procedur iteracyjnych, wyznaczających najmniejszą wartość sumy kwadratów błędów pomiędzy wartościami empirycznymi i teoretycznymi. Do szacowania wykorzystano algorytm Marquardta realizujący nieliniową MNK. Obliczenia wykonano w programie TableCurve 2D for Windows, AISN Software Inc. [8].

Do konstrukcji modelu powierzchni odpowiedzi wykorzystano funkcje wielomianowe drugiego i trzeciego stopnia. Szacowania parametrów modelu powierzchni odpowiedzi dokonano z wykorzystaniem MNK. Obliczenia wykonano w programie TableCurve 3D for Windows, SYSTAT Software Inc.

## Wyniki i dyskusja

### Wyniki analiz mikrobiologicznych

Wyniki oznaczeń przedstawiono w tab. 1. i 2. W trakcie obróbki cieplnej w temp.  $65\text{--}75^{\circ}\text{C}$  inaktywowana jest większość komórek wegetatywnych, natomiast zakażenie wtórne determinuje okres przydatności produktu mięsnego do spożycia, który wg Borch i wsp. [2] wynosi od kilku dni do kilku miesięcy. Wpływa na to wiele różnych czynników, jak: temperatura, skład atmosfery, poziom NaCl,  $a_w$ .

Oznaczenia mikrobiologiczne gotowego produktu mięsnego, po obróbce cieplnej, wykazały zanieczyszczenie mikroflorą średnio na poziomie  $3,79$  log jtk/g. W wyniku pieczenia uzyskano statystycznie istotną redukcję ogólnej liczby drobnoustrojów średnio o około  $1,07$  jednostki logarytmicznej. Mikroflora dodana jako inokulum *Pseudomonas fluorescens* w ilości  $1,89$  log jtk/g (wartość średnia) do produktu mięsnego została następnie oznaczona razem z mikroflorą naturalną, uzyskano średnią wartość  $4,13$  log jtk/g.

W trakcie przechowywania produktów mięsnych w temp.  $10^{\circ}\text{C}$  nie stwierdzono istotnie statystycznego hamującego wpływu lizozymu na rozwój ogólnej liczby drobnoustrojów (tab. 1). W przypadku bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, przez pierwsze 8 dni przechowywania, zaobserwowano istotną statystycznie redukcję liczby bakterii pod wpływem lizozymu (tab. 2). W kolejnych dniach działanie enzymu było mniej skuteczne – nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy w liczbie oznaczanych bakterii pomiędzy próbą kontrolną i próbą z dodatkiem lizozymu.

W czasie przechowywania produktów mięsnych przez 16 dni w temp. 20°C, nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w ogólnej liczbie drobnoustrojów pomiędzy próbą kontrolną i próbą z dodatkiem lizozymu (tab. 1). Liczba bakterii z rodzaju *Pseudomonas* była statystycznie istotnie wyższa w próbie z dodatkiem lizozymu niż w próbie kontrolnej już po 4 dniach przechowywania i utrzymywała się na tym poziomie do końca okresu przechowalniczego (tab. 2).

Tabela 1

Ogólna liczba drobnoustrojów [log cfu/g] oraz liczba bakterii z rodzaju *Pseudomonas* [log jtk/g] w produktach mięsnych z dodatkiem lizozymu (25 000 U/g) oraz inokulum.

Total plate count [log cfu/g] and plate count of *Pseudomonas* bacteria [log cfu/g] in model meat products with added lysozyme (25 000 U/g) and inoculum.

Temperatura przechowywania 10°C Temperature of storage 10°C		OLD*		LBPs*		OLD <sup>1</sup> *		LBPs <sup>1</sup> *	
		K	L	K	L	K	L	K	L
Czas przechowywania [dni] Time of storage [days]	0	3,79 (0,98)		3,11 (0,30)		4,13 (1,04)		3,31 (0,67)	
	4	3,73 (0,60)	3,40 (0,50)	3,96 (0,80)	3,14 (0,61)	3,41 (0,52)	2,90 (0,48)	4,67 (1,17)	3,69 (0,99)
	8	3,71 (0,78)	3,43 (0,59)	4,89 (0,34)	3,45 (0,54)	3,84 (0,95)	3,55 (0,91)	4,97 (1,03)	4,26 (0,83)
	12	4,26 (0,45)	4,50 (0,98)	4,82 (1,29)	4,59 (0,49)	4,76 (0,78)	4,83 (0,37)	5,17 (0,57)	5,37 (0,49)
	16	5,00 (0,84)	5,36 (0,70)	5,61 (1,70)	5,22 (0,82)	5,71 (0,53)	6,36 (1,23)	6,58 (1,46)	5,43 (1,15)

Objaśnienia:

OLD – ogólna liczba bakterii / total plate count of bacteria,

LBPs – liczba bakterii z rodz. *Pseudomonas*, występujących jako naturalna mikroflora / plate count of *Pseudomonas* bacteria in samples without inoculum,

OLD<sup>1</sup> – ogólna liczba bakterii w próbkach z inokulum / total plate count of bacteria in inoculated samples,

LBPs<sup>1</sup> – liczba bakterii z rodz. *Pseudomonas* w próbkach z inokulum / plate count of *Pseudomonas* bacteria in samples with inoculum.

\*Wartości średnie. W nawiasach odchylenie standardowe. K – próba kontrolna – bez lizozymu; L – próba z lizozymem.

\*Mean value. The standard deviation in brackets; K – control sample – without lysozyme; L – sample with lysozyme.

W przypadku ogólnej liczby drobnoustrojów nie stwierdzono różnic pomiędzy próbą kontrolną i próbą z dodatkiem lizozymu w obu badanych zakresach temperatury. Nie wykazano zatem hamującego działania lizozymu. Podobne wyniki, wskazujące na brak oddziaływania natywnego enzymu, uzyskali Masschalck i wsp. [15].

W przypadku bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, prawdopodobnie łączne oddziaływanie niskiej temperatury i dodatku lizozymu istotnie redukowało liczbę bakterii przez 8 dni przechowywania. Liczba oznaczonych bakterii w próbie z dodanym lizozymem, przechowywanej w temp. 20°C była istotnie wyższa w porównaniu z próbą kontrolną.

Tabela 2

Ogólna liczba drobnoustrojów [log cfu/g] oraz liczba bakterii z rodzaju *Pseudomonas* [log jtk/g] w produktach mięsnych z dodatkiem lizozymu (25 000 U/g) oraz inokulum.

Total plate count [log cfu/g] and plate count of *Pseudomonas* bacteria [log cfu/g] in model meat products with added lysozym (25 000 U/g) and inoculum.

Temperatura przechowywania 20°C Temperature of storage 20°C		OLD *		LBPs *		OLD' *		LBPs' *	
		K	L	K	L	K	L	K	L
Czas przechowywania [dni] Time of storage [days]	0	3,79 (0,98)		3,11 (0,30)		4,13 (1,04)		3,31 (0,67)	
	4	6,51 (0,36)	6,32 (0,59)	4,11 (0,61)	4,65 (0,64)	7,46 (0,72)	6,25 (0,61)	4,61 (0,55)	4,03 (0,77)
	8	7,11 (0,47)	7,18 (0,27)	5,56 (0,72)	6,22 (1,15)	7,42 (0,40)	7,47 (0,27)	6,32 (0,74)	6,03 (0,65)
	12	6,91 (0,44)	7,02 (0,63)	5,74 (1,23)	7,77 (0,20)	7,83 (0,62)	7,09 (0,55)	7,41 (0,80)	7,71 (0,29)
	16	7,22 (0,64)	7,14 (0,57)	6,39 (1,16)	7,61 (0,55)	8,00 (0,49)	7,08 (0,44)	7,86 (0,63)	7,54 (0,47)

Oznaczenie jak w tab. 1. / Notation like in tab. 1.

W produktach mięsnych przechowywanych w temp. 10 i 20°C lizozym w formie monomeru nie wpływał istotnie hamująco na bakterie z rodzaju *Pseudomonas spp.*, jak również *Pseudomonas fluorescens*. Otrzymane wyniki są porównywalne z doświadczeniami innych autorów, którzy nie stwierdzali aktywności lizozymu w formie monomeru w stosunku do bakterii G(-), takich jak: *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *P. fluorescens* [4, 14, 16].

W przypadku przechowywania produktów z dodatkiem inokulum *P. fluorescens* w temp. 10°C stwierdzono 4. dnia przechowywania statystycznie istotnie niższą ogólną liczbę drobnoustrojów w próbie z lizozymem w porównaniu z próbą kontrolną. W trakcie dalszego przechowywania produktów mięsnych liczba drobnoustrojów wzrosła w próbie kontrolnej, różnice między próbą kontrolną i próbą z lizozymem były istotne statystycznie. Ostatniego dnia przechowywania liczba drobnoustrojów była jednak statystycznie istotnie wyższa w próbie z lizozymem.

Podobnie, w przypadku ogólnej liczby bakterii z rodzaju *Pseudomonas* zaobserwowano statystycznie istotnie niższą liczbę bakterii w próbie z lizozymem niż w kontrolnej, po 4 dniach przechowywania. Liczba drobnoustrojów wzrosła w czasie przechowywania próby z lizozymem, ale oznaczone wartości nie różniły się istotnie statystycznie od wartości w próbie kontrolnej. Ostatniego dnia przechowywania stwierdzono statystycznie mniej komórek drobnoustrojów w próbie z lizozymem niż w próbie kontrolnej.

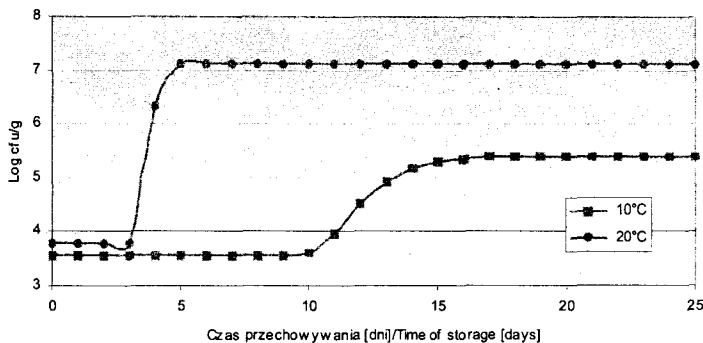
W produkcie z dodanym inokulum *P. fluorescens*, przechowywanym w temp. 20°C stwierdzono statystycznie istotnie niższe wartości ogólnej liczby drobnoustrojów (z wyjątkiem 8. dnia) w próbach z dodatkiem lizozymu niż w próbie kontrolnej.

W przypadku bakterii z rodzaju *Pseudomonas* nie stwierdzono różnic między liczbą drobnoustrojów w próbie kontrolnej i próbie z dodatkiem lizozymu. Można stwierdzić, iż statystycznie istotne hamujące działanie lizozymu odnotowano w przypadku ogólnej liczby drobnoustrojów w produktach mięsnych przechowywanych w 20°C.

W przypadku przechowywania w temp. 10°C lizozym dodany w formie monomeru nie wywierał istotnego wpływu na rozwój bakterii *Pseudomonas*. Równoległe oznaczenia przeprowadzone w próbach z dodatkiem inokulum i lizozymu sugerują wystąpienie wyraźniejszego, ewentualnego wpływu dodatku substancji konserwującej na bakterie *Pseudomonas*. Jednak nie stwierdzono istotnie statystycznych różnic pomiędzy próbą kontrolną (z dodatkiem inokulum) a próbą z dodatkiem inokulum i lizozymu.

### Konstrukcja modeli pierwszorzędowych

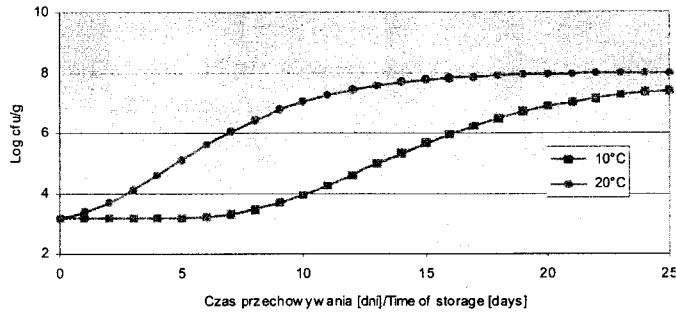
Na rys. 1., 2. i 3. przedstawiono wybrane modele pierwszorzędowe opracowane z wykorzystaniem funkcji Gompertza i logistycznej, opisujące rozwój ogólnej liczby drobnoustrojów oraz liczby bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, występujących naturalnie



Rys. 1. Model Gompertza wzrostu OLD w modelowych produktach mięsnych utrwalonych lizozymem, przechowywanych w temp. 10°C i 20°C.

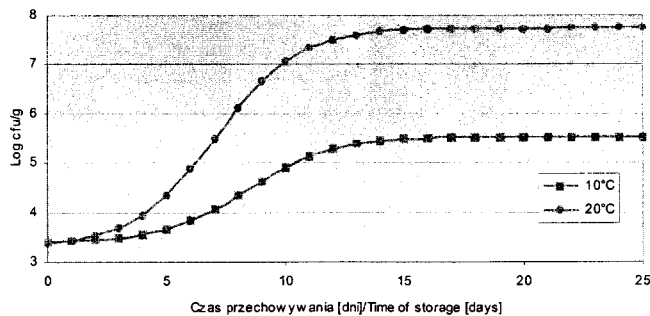
Fig. 1. The Gompertz model of total plate count growth in model meat products preserved with lysozyme stored at 10°C and 20°C.

i dodanych jako inokulum *P. fluorescens* (log jtk/g) do modelowych produktów mięsnych, utrwalonych lizozymem w formie monomeru o aktywności 25 000 U/g przechowywanych w temp. 10 i 20°C.



Rys. 2. Model Gompertz wzrostu LBP<sub>s</sub> w modelowych produktach mięsnych utrwalonych lizozymem przechowywanych w temp. 10°C i 20°C.

Fig. 2. The Gompertz model of total plate count of *Pseudomonas spp.* growth in model meat products preserved with lysozyme stored at 10°C and 20°C.



Rys. 3. Model logistyczny wzrostu LBP<sub>s</sub> w modelowych produktach mięsnych utrwalonych lizozymem przechowywanych w temp. 10°C i 20°C.

Fig. 3. The Logistic model of plate count of *Pseudomonas fluorescens* growth in model meat products preserved with lysozyme stored at 10°C and 20°C.

Aproksymacja modeli do danych empirycznych była wysoka, na poziomie 90–99% (tab. 3). Modele opracowano w oparciu o dane zagregowane.

Modele wzrostu drobnoustrojów w produktach utrwalonych lizozymem charakteryzowały się wysokimi współczynnikami determinacji. Ze względu na brak danych literaturowych na temat stanu mikrobiologicznego produktów mięsnych z uwzględnieniem dodatku naturalnej substancji konserwującej jaką jest lizozym, trudno otrzymane modele odnieść do doświadczeń innych autorów. Można jednak przypuszczać, że dobre dopasowanie modeli pierwszorzędowych (Gomperta i logistycznego), pozwoli w przyszłości na opracowanie modeli powierzchni odpowiedzi wpływu czynni-



ków środowiskowych na kinetyczne parametry wzrostu. W ten sposób opracowano niektóre ze znanych obecnie programów komputerowych służących do prognozowania mikrobiologicznego [1, 19].

Tabela 3

Współczynniki determinacji  $R^2$  [%] modeli rozwoju różnych grup drobnoustrojów w modelowych produktach mięsnych przechowywanych w dwóch zakresach temperatury.

The determination coefficients  $R^2$  [%] for models of growth of different groups of bacteria in model meat products stored in different temperatures.

Grupa drobnoustrojów Group of microorganisms	Rodzaj modelu Kind of model	Temperatura przechowywania Temperature of storage	
		10°C	20°C
OLD	Gompertza	96	99
	Logistyczny	89	99
LBPs	Gompertza	99	98
	Logistyczny	98	98
LBPs'	Gompertza	97	98
	Logistyczny	98	99

Na podstawie uzyskanych parametrów kinetycznych: szybkości wzrostu i czasu generacji (model Gompertza) można stwierdzić, że bakterie tlenowe wyrażone jako ogólna liczba drobnoustrojów w produktach przechowywanych w temp. 10°C, nie były hamowane przez lizozym w formie monomeru (tab. 4). W przypadku bakterii z rodzaju *Pseudomonas* występujących naturalnie w produktach mięsnych stwierdzono niższy współczynnik szybkości wzrostu i dłuższy czas generacji w próbce utrwalonej lizozymem, co wskazuje na hamujący wpływ wywierany przez ten enzym. Wyniki

Tabela 4

Parametry kinetyczne wzrostu oszacowane na podstawie funkcji Gompertza i logistycznej badanych grup drobnoustrojów w modelowych produktach mięsnych utrwalonych lizozymem.

The kinetics parameters of growth of examined bacteria groups in model meat products preserved with lysozyme estimated on Gompertz and logistic function.

Rodzaj próby Kind of sample	Temperatura przechowywania 10°C Temperature of storage 10°C				Temperatura przechowywania 20°C Temperature of storage 20°C			
	$\mu$	GT	$\lambda$	N	$\mu$	GT	$\lambda$	N
OLD K	0,43	0,69	10,70	5,24	1,09	0,27	0,00	7,23
	-	-	48,30	-	1,62	0,18	-0,04	7,23
OLD	0,55	0,54	10,23	540	1,12*	0,26*	-0,001*	7,16*
	205,29	0,001	42,39	-	1,29**	0,23**	-0,03**	7,15**

c.d. tabeli 4

LBPs K	0,59	0,50	-6,34	6,66	0,39*	0,76*	1,50*	6,20*
	1,32	0,22	-14,53	6,68	0,53*	0,55*	2,60*	6,15*
LBPs	0,36*	0,83*	8,01*	7,68*	0,51***	0,58***	0,27***	7,99***
	29,34	0,01	38,77	460,17	0,72***	0,41***	2,66***	7,89***
LBPs <sup>l</sup> K	1,66	0,18	-43,63	11,08	0,46*	0,65*	1,18*	8,17*
	2,15	0,13	-48,03	10,90	0,64*	0,46*	2,35*	8,05*
LBPs <sup>l</sup>	0,23***	1,26***	3,57***	5,73***	8,71	0,03	7,72	7,63
	0,44***	0,67***	6,65***	5,52***	0,94**	0,31**	5,30**	7,73**

$\mu$  – wsp. szybkości wzrostu [log (cfug)/h]; GT – czas generacji [h];  $\lambda$  – długość lag fazy [dni], N – max gęstość populacji [log cfu/g],

$\mu$  – max. rate of growth coefficient [log (cfug)/h]; GT – generation time [h];  $\lambda$  – lag time [days], N – max. density of population [log cfu/g].

K – próba bez lizozymu

K – sample without lysozyme

\* $0,00 < p < 0,01$ ; \*\* $0,00 < p < 0,1$ ; \*\*\* $0,05 < p < 0,1$ .

szacowania lag fazy (ujemne wartości) i maksymalnej gęstości populacji OLD i OLPs są trudne do zinterpretowania (tab. 4).

Lizozym wywierał istotny wpływ na wzrost bakterii *P. fluorescens* powodując istotne wydłużenie czasu generacji oraz zwolnienie tempa wzrostu (tab. 4).

W przypadku produktów przechowywanych w temp. 20°C nie zanotowano hamującego wpływu lizozymu na żadną z badanych grup drobnoustrojów (tab. 4).

### Konstrukcja modeli powierzchni odpowiedzi

Rys. 4–6 przedstawiają modele wielomianowe drugiego stopnia wzrostu ogólnej liczby drobnoustrojów, ogólnej liczby bakterii *Pseudomonas* oraz ogólnej liczby bakterii dodanych jako *P. fluorescens* w modelowych produktach mięsnych utrwalonych lizozymem o aktywności 25 000U/g, przechowywanych w temp. 10 i 20°C. Dopasowanie modeli jest na wysokim poziomie, odpowiednio w przypadku OLD, LBPs i LBPs<sup>l</sup> – 97, 98 i 94%. Oznacza to, że zmienność populacji drobnoustrojów jest wyjaśniona przez zmienne niezależne: czas i temperaturę przechowywania.

W tab. 5. przedstawiono wartości OLD (log cfu/g) w modelowych produktach mięsnych ekstrapolowane do 20. dnia przechowywania, w temp. chłodniczej 0–5°C oraz w temp. 15 i 25°C. Oszacowana na podstawie modelu, początkowa liczba drobnoustrojów w produktach mięsnych przechowywanych w temp. 0–25°C była równa 3,86. W kolejnych dniach przechowywania (4., 8., 12.) w temp. 0 i 5°C oszacowane wartości OLD były niskie, a 20. dnia bardzo wysokie, odpowiednio 9,0 i 8,0 log jtk/g. Ekstrapolacja ta jest trudna do zinterpretowania i na jej podstawie sugeruje się raczej małą przydatność opracowanego modelu do prognozowania wzrostu drobnoustrojów w produktach utrwalonych lizozymem w formie monomeru, przechowywanych w chłodniczych zakresach temperatury.

Tabela 5

Ogólna liczba drobnoustrojów [log jtk/g] w produktach mięsnych utrwalonych lizozymem, przechowywanych w różnych zakresach temperatury (dane ekstrapolowane do 20. dnia przechowywania oraz 0°C, 5°C, 15°C, 25°C).

The total plate count [log cfu/g] in model meat products preserved with lysozyme stored at different temperatures (data extrapolate to 20 days of storage and 0°C, 5°C, 15°C, 25°C).

Czas przechowywania [dni] Time of storage [days]	Temperatura przechowywania [°C] Temperature of storage [°C]					
	0	5	10	15	20	25
0	3,8688	3,8688	3,8688	3,8688	3,8688	3,8688
4	0,9737	2,2148	3,4559	4,6970	5,9381	7,1792
8	0,0296	1,8068	3,5839	5,3611	7,1382	8,9154
12	1,0364	2,6446	4,2528	5,8610	7,4692	9,0774
16	3,9940	4,7282	5,4624	6,1967	6,9309	7,6651
20	8,9026	8,0578	7,2130	6,3682	5,5234	4,6786

W przypadku zastosowania modelu powierzchni odpowiedzi (rys. 4, tab. 5), ogólnej liczby drobnoustrojów w produktach mięsnych przechowywanych w temp. 10–25°C ekstrapolacja wartości była wiarygodna. W jej wyniku oszacowano niższe wartości log cfu/g w produktach przechowywanych w temp. 20 i 25°C w odniesieniu do 20. dnia przechowywania aniżeli do 16. dnia. Wydaje się, że jest to możliwe, gdyż szybkość wzrostu drobnoustrojów w tych zakresach temperatury jest duża, do 12. dnia przechowywania, a potem prawdopodobnie następuje faza stacjonarna i zamierania populacji drobnoustrojów w produktach mięsnych.

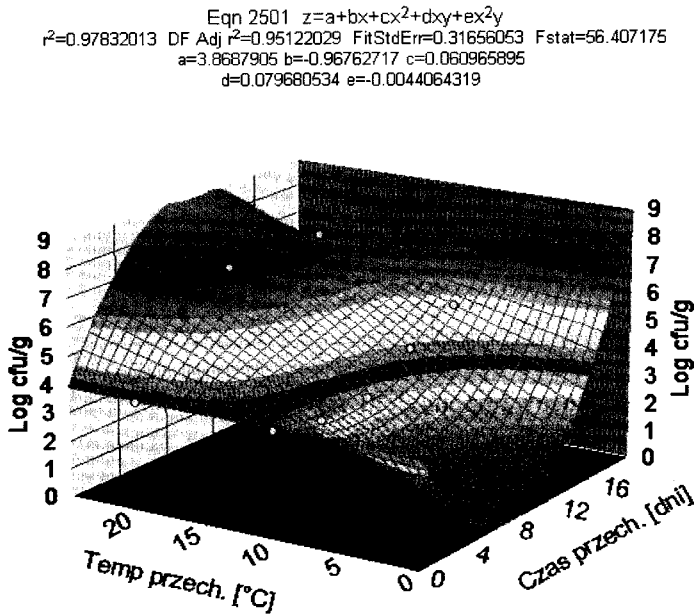
Tabela 6

Ogólna liczba bakterii *Pseudomonas* [log cfu/g] w produktach mięsnych utrwalonych lizozymem przechowywanych w różnych zakresach temperatury (dane ekstrapolowane do 20 dnia przechowywania oraz 0°C, 5°C, 15°C, 25°C).

The total plate count of *Pseudomonas spp.* bacteria [log cfu/g] in model meat products preserved with lysozyme stored at different temperatures (data extrapolate to 20 days of storage and 0°C, 5°C, 15°C, 25°C).

Czas Przechowywania [dni] Time of storage [days]	Temperatura przechowywania [°C] Temperature of storage [°C]					
	0	5	10	15	20	25
0	3,0872	3,0872	3,0872	3,0872	3,0872	3,0872
4	1,2119	2,1455	3,0792	4,0129	4,9466	5,8803
8	0,7570	2,1567	3,5564	4,9562	6,3559	7,7556
12	1,7226	3,1207	4,5188	5,9169	7,3150	8,7132
16	4,1085	5,0374	5,9663	6,8952	7,8240	8,7529
20	7,9149	7,9069	7,8989	7,8909	7,8829	7,8748

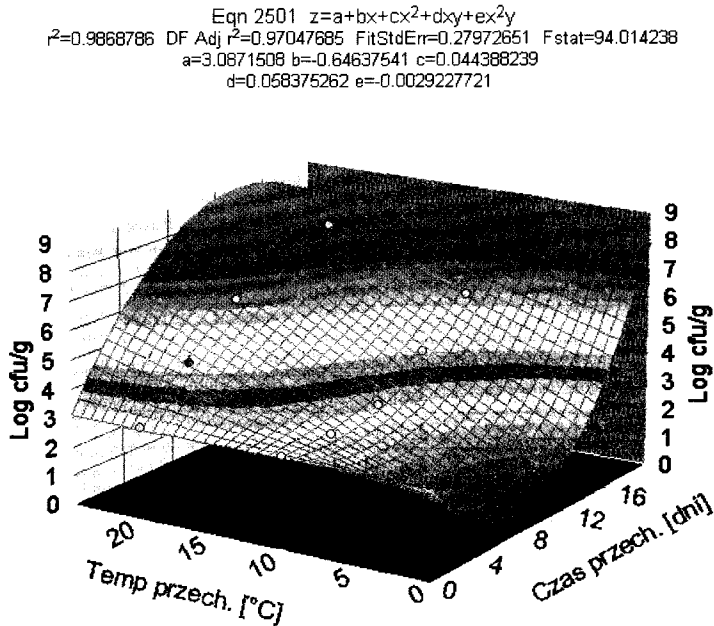
W przypadku modelu wzrostu bakterii z rodzaju *Pseudomonas* (rys. 5, tab. 6), występujących w produktach mięsnych przechowywanych w temp. chłodniczej, stwierdzono podobny, jak w przypadku OLD, efekt nieprawidłowej ekstrapolacji. Szacowana przez model liczba bakterii *Pseudomonas* 20. dnia przechowywania w temp. 25°C wskazuje na początek fazy stacjonarnej.



Rys. 4. Wielomianowa powierzchnia odpowiedzi (st. 2) OLD w modelowych produktach mięsnych, utrwalonych lizozymem przechowywanych w różnych zakresach temperatury.

Fig. 4. Polynomial response surface (second degree) of total plate count in model meat products preserved with lysozyme stored at different temperatures.

Objaśnienia:  $z$  – log OLD (jtk/g) / log total plate count of bacteria (cfu/g);  $x$  – czas (dni) / time (days);  $y$  – dodatek lizozymu (U/g) / level of lysozyme (U/g);  $a$  – stała / constans;  $b, c, d, e$  – parametry funkcji wielomianowej / parameters of polynomial function;  $r^2$  – współczynnik determinacji / R square;  $\text{adj } r^2$  – zrewidowany współczynnik determinacji / adjusted R square; wartość testu  $F$  / fit standard error; wartość statystyki  $F$  /  $F$  statistic.



Rys. 5. Wielomianowa powierzchnia odpowiedzi (st. 2) OLPs w modelowych produktach mięsnych utrwalonych lizozymem przechowywanych w różnych zakresach temperatury.

Fig. 5. Polynomial response surface (second degree) of total plate count of *Pseudomonas spp.* bacteria in model meat products preserved with lysozyme stored at different temperatures.

Objaśnienia:  $z$  – log LBPs (jtk/g) / log plate count of *Pseudomonas* bacteria (cfu/g);  $x$  – czas (dni) / time (days);  $y$  – dodatek lizozymu (U/g) / level of lysozyme (U/g);  $a$  – stała / constans;  $b, c, d, e$  – parametry funkcji wielomianowej / parameters of polynomial function;  $r^2$  – współczynnik determinacji / R square;  $\text{adj } r^2$  – zrewidowany współczynnik determinacji / adjusted R square; wartość testu F / fit standard error; wartość statystyki F / F statistic.

Ekstrapolacja na podstawie opracowanego modelu rozwoju bakterii *Pseudomonas* dodanych jako inokulum *P. fluorescens* do produktów mięsnych, przechowywanych w temp. 0–25°C (tab. 5) jest bardziej wiarygodna niż oszacowane na podstawie modeli wartości OLD i OLPs (tab. 5 i 6). Wskazuje to na możliwość zastosowania modelu (rys. 6) do prognozowania rozwoju bakterii *P. fluorescens* w produktach mięsnych, utrwalonych lizozymem, przechowywanych we wszystkich zakresach temperatury.

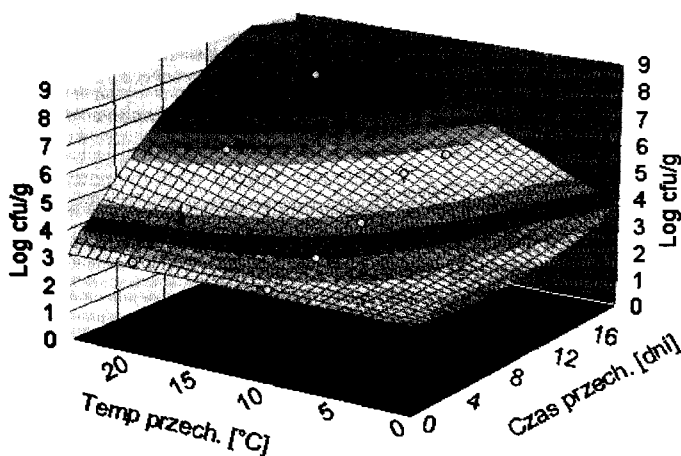
Tabela 7

Ogólna liczba bakterii *Pseudomonas fluorescens* [log cfu/g] w produktach mięsnych utrwalonych lizozymem przechowywanych w różnych zakresach temperatury (dane ekstrapolowane do 20 dnia przechowywania oraz 0°C, 5°C, 15°C, 25°C).

The plate count [log cfu/g] in model meat products preserved with lysozyme stored at different temperatures (data extrapolate to 20 days of storage and 0°C, 5°C, 15°C, 25°C).

Czas przechowywania [dni] Time of storage [days]	Temperatura przechowywania [°C] / Temperature of storage [°C]					
	0	5	10	15	20	25
0	3,1099	3,1099	3,1099	3,1099	3,1099	3,1099
4	2,9041	3,3525	3,8008	4,2492	4,6976	5,1459
8	2,8637	3,6528	4,4418	5,2308	6,0199	6,8089
12	2,9887	4,0107	5,0328	6,0548	7,0768	8,0988
16	3,2791	4,4264	5,5737	6,7210	7,8683	9,0157
20	3,7349	4,8998	6,0647	7,2296	8,3945	9,5594

Eqn 2501  $z=a+bx+cx^2+dxy+ex^2y$   
 $r^2=0.94947853$  DF Adj  $r^2=0.8663267$  FitStdErr=0.49305016 Fstat=23.491958  
 $a=3.1098915$   $b=-0.072118663$   $c=0.0051685119$   
 $d=0.025110464$   $e=-0.00067307264$



Rys. 6. Wielomianowa powierzchnia odpowiedzi (st. 2)  $OLPs^I$  w modelowych produktach mięsnych utrwalonych lizozymem, przechowywanych w różnych zakresach temperatury.

Fig. 6. Polynomial response surface (second degree) of plate count of *Pseudomonas fluorescens* in model meat products preserved with lysozyme stored at different temperatures.

Objaśnienia:  $z$  – log LBPs<sup>I</sup> (jtk/g) / log plate count of *Pseudomonas* bacteria in samples with inoculum (cfu/g);  $x$  – czas (dni) / time (days);  $y$  – dodatek lizozymu (U/g) / level of lysozyme (U/g);  $a$  – stała / constans;  $b, c, d, e$  – parametry funkcji wielomianowej / parameters of polynomial function;  $r^2$  – współczynnik determinacji / R square; adj  $r^2$  – zrewidowany współczynnik determinacji / adjusted R square; wartość testu F / fit standard error; wartość statystyki F / F statistic.

## Wnioski

1. Nie wykazano hamującego działania lizozymu, dodanego do produktów mięsnych w formie monomeru, na ogólną liczbę drobnoustrojów w badanych zakresach temperatury przechowywania, tj. 10 i 20°C.  
W przypadku bakterii z rodzaju *Pseudomonas* łączne oddziaływanie niskiej temperatury (10°C) i dodatku lizozymu istotnie redukowało liczbę bakterii do 8. dnia przechowywania produktów.
2. Wyniki badań mikrobiologicznych posłużyły do konstruowania modeli Gomperta i logistycznych, pozwalających na wyznaczenie kinetycznych parametrów wzrostu, opisujących rozwój drobnoustrojów w produktach z mięsa rozdrobnionego w czasie przechowywania, w poszczególnych zakresach temperatury.
3. Skonstruowane modele wielomianowe drugiego stopnia pozwoliły na wiarygodną ekstrapolację w przypadku produktów przechowywanych w temperaturze 10–25°C. Były one najbardziej odpowiednie do opisu, w postaci powierzchni odpowiedzi, wpływu dwóch zmiennych na rozwój wybranych grup drobnoustrojów w produktach mięsnych.

Pracę zrealizowano w ramach grantu KBN nr 6PO6T02121.

## Literatura

- [1] Avery S.M., Hudson J.A., Phillips D.M.: Use of response surface models to predict bacterial growth from time/temperature histories. *Food Control*, 1996, **3** (7), 121-128.
- [2] Borch E., Kant-Muermans M-L., Blixt Y.: Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, 1996, **1** (33), 103-120.
- [3] Buchanan R.L.: Developing and distributing user-friendly application software. *J. Ind. Microbiol.*, 1993, **3-5** (12), 251-255.
- [4] Carneiro de Melo A.M.S., Cassar C.A., Miles R.J.: Trisodium phosphate increases sensitivity of gram-negative bacteria to lysozyme and nisin. *J. Food Prot.*, 1998, **7** (61), 839-844.
- [5] Davidson P.M.: Preservatives and Preservation Methods. In: Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J. (ed.) *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, ASM Press, Washington 1997.
- [6] El-Kest S.E., Marth E.H.: Lysozyme and lipase after unfrozen and frozen/thawed cells of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 1992, **10** (55), 777-781.
- [7] El-Kest S.E., Marth E.H.: Transmission electron microscopy of unfrozen and frozen/thawed cells of *Listeria monocytogenes* treated with lipase and lysozyme. *J. Food Prot.*, 1992, **9** (55), 687-696.
- [8] Goryl A., Jędrzejczyk Z., Kukuła K., Osiewalski J., Walkosz A.: Wprowadzenie do ekonometrii w przykładach i zadaniach. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 1996.
- [9] Hauben K.J.A., Wuytack E.Y., Soontjens C.C.F., Michels C.W.: High-pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer-membrane permeability. *J. Food Prot.*, 1996, **4** (59), 350-355.
- [10] Jałosińska-Pieńkowska M.: Prognozowanie bezpiecznego okresu trwałości modelowych wyrobów mięsnych gotowych do spożycia, Praca doktorska, SGGW, Warszawa 1999

- [11] Kijowski J., Leśniewski G.: Wykorzystanie lizozymu do utrwalania żywności w diagnostyce medycznej i farmakologii. *Biotechnologia*, 1995, **2** (29), 130-140.
- [12] Kołożyn-Krajewska D., Sikora T.: HACCP. Koncepcja i system zapewniania bezpieczeństwa zdrowotnego żywności, SIT Spoż, Warszawa 1999.
- [13] Kołożyn-Krajewska D.: Studium zapewnienia jakości żywności w aspekcie bezpieczeństwa zdrowotnego na przykładzie wybranych produktów mięsnych. Praca habilitacyjna. Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa 1998.
- [14] Marciszewska C.: Zastosowanie lizozymu jako czynnika ograniczającego rozwój bakterii charakterystycznych dla tuszek kurcząt przechowywanych w warunkach chłodniczych. Autoreferat rozprawy doktorskiej, AR Poznań 2000.
- [15] Masschalck B., Van Houdt R., Van Haver E.G.R., Michiels C.W.: Inactivation of gram-negative bacteria by lysozyme, denaturated lysozyme and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, **1** (67), 339-344.
- [16] Payne K.D., Oliver S.P., Davidson P.M.: Comparison of EDTA and apo-lactoferrin with lysozyme on the growth of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *J. Food Prot.* 1994, **1** (57), 62-65.
- [17] PN-A-82055-6:1994. Mięso i przetwory mięsne. Badania mikrobiologiczne, oznaczanie ogólnej liczby drobnoustrojów.
- [18] PN-ISO 13720: 1999. Mięso i przetwory mięsne. Oznaczanie liczby bakterii z rodzaju *Pseudomonas*.
- [19] Ross T., McMeekin T.A.: Predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol.*, 1994, 3-4 (23), 241-264.
- [20] Tranter H.S.: Lysozyme, ovotransferrin and avidin. In Dillon V.M., Board R.G. (ed), *Natural antimicrobial systems and food preservation*. CAB International, Wallingford 1994.
- [21] Van Gerwen S., Zwietering M.H.: Growth and inactivation models to be used in quantitative risk assessments. *J. Food Prot.*, 1998, **11** (61), 1541-1549.
- [22] Whiting R.C., Buchanan R.L.: Microbial modeling. *Food Technol.*, 1994, **6** (48), 113-119.

## APPLICATION OF PROGNOSTIC MICROBIOLOGY METHODS FOR EVALUATION OF GROWTH OF SAPROPHYTIC BACTERIA IN MEAT PRODUCTS PRESERVATED WITH LYSOZYME IN MONOMER FORM

### Summary

The aim of the work was construction of mathematical models of growth of total plate count of bacteria and saprophytic *Pseudomonas spp.* bacteria occurring in model meat products preserved with lysozyme in monomer form. The microbiological experiment was carried out by traditional plate method. The experimental data were fitted to first order models (Gompertz and logistic) and response surface models (RSM). The Marquardt algorithm was used to evaluate parameters of Gompertz and logistic functions. The least square method was used for assessment of parameters of polynomial functions. Results of first order models were kinetics parameters of growth: lag time duration, growth rate, generation time, density of population. The influence of environmental factors on bacteria population growth was determined on the basis the RSM.

**Key words:** food, microbiology, prediction, meat products. ☒