

ELŻBIETA ROSIAK, DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA

MODELE WZROSTU BAKTERII *PSEUDOMONAS* W PRODUKTACH GOTOWYCH DO SPOŻYCIA

Streszczenie

Celem pracy było opracowanie matematycznych modeli wzrostu bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w modelowych produktach mięsnych przy uwzględnieniu następujących czynników: czas i temperatura. W badaniach zastosowano „model” produktu mięsnego reprezentujący grupę produktów z mięsa rozdrobnionego.

Otrzymane wyniki badań pozwoliły na utworzenie pierwszorzędowych modeli Gomperta i logistycznych, które dobrze opisywały rozwój drobnoustrojów w produktach z mięsa rozdrobnionego w czasie przechowywania w zróżnicowanej temperaturze. Uzyskane modele liniowe Conline'a nie były wystarczająco dobrze dopasowane. Drugorzędowy model Ratkowsky'ego okazał się najbardziej przydatny do oszacowania współczynnika szybkości wzrostu badanych grup drobnoustrojów. Wielomiany drugiego stopnia były najbardziej odpowiednie do opisu, w postaci powierzchni odpowiedzi, wpływu dwóch zmiennych na rozwój wybranych grup drobnoustrojów w produktach mięsnych. Podjęto również próbę zastosowania nowego narzędzia w prognozowaniu mikrobiologicznym, jakim są sieci neuronowe. Do uzyskiwania sieci o dobrej jakości (niski iloraz odchyień) niezbędna jest duża liczba przypadków uczących.

Słowa kluczowe: produkty mięsne, mikrobiologia, modele prognostyczne

Wprowadzenie

Mikrobiologia prognostyczna stanowi nowe podejście do zapewniania jakości i bezpieczeństwa żywności. Możliwości zastosowania wyników prognozowania to: przewidywanie przydatności i bezpieczeństwa spożywanej żywności, określenie limitów krytycznych w krytycznych punktach kontrolnych, oszacowanie konsekwencji błędnie przeprowadzonego procesu produkcji czy przechowywania.

Jedną z tez mikrobiologii prognostycznej zakłada, że reakcja populacji mikroorganizmów na czynniki środowiskowe (temperatura, pH, aktywność wody,

Dr inż. E. Rosiak, prof. dr hab. D. Kołożyn-Krajewska, Zakład Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydz. Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, SGGW, ul. Nowoursynowska 159C, 02-776 Warszawa

dodatek substancji konserwujących, atmosfera przechowywania, procesy technologiczne, skład chemiczny) jest powtarzalna. Czynniki te, a w szczególności te oddziałujące najintensywniej na daną grupę produktów żywnościowych mogą być określone. Na podstawie zebranych danych wyznaczane są funkcje opisujące rozwój bakterii w określonym środowisku. Na podstawie wyznaczonych funkcji określone są parametry kinetyczne wzrostu populacji drobnoustrojów.

Temperatura przechowywania produktów żywnościowych jest najważniejszym czynnikiem decydującym o rozwoju mikroorganizmów. Dlatego wśród opracowywanych modeli matematycznych opisujących rozwój drobnoustrojów pod wpływem różnych czynników środowiskowych najliczniejszą grupę stanowią modele pozwalające na wyznaczenie szybkości wzrostu, długości trwania lagfazy, czasu osiągnięcia maksymalnej gęstości populacji pod wpływem temperatury [3, 17].

Zepsucie przechowywanego w warunkach tlenowych mięsa i produktów mięsnych powodowane jest przez dominujące wśród mikroflory saprofitycznej bakterie *Pseudomonas*. Mają one zdolność wytwarzania w niskiej temperaturze zewnątrzkomórkowych enzymów: lipaz i proteinaz. W przypadku, gdy populacja drobnoustrojów przekracza 10^7 – 10^9 jtk/g, enzymy te odpowiedzialne są za powstawanie nieodwracalnych zmian jakości mięsa oraz nieakceptowanego zapachu [3, 4, 11, 12, 20].

Celem pracy był dobór modeli prognostycznych określających wzrost bakterii *Pseudomonas*, w modelowym produkcie z mięsa wołowego rozdrobnionego i gotowego do spożycia, przechowywanego w zróżnicowanej temperaturze. Porównano dopasowanie funkcji Gompertza i logistycznej do danych eksperymentalnych, określono wpływ temperatury na względną szybkość wzrostu z wykorzystaniem modelu Ratkowsky'ego, określono wpływ czasu i temperatury na badane drobnoustroje z wykorzystaniem funkcji wielomianowej. Podjęto również próbę zastosowania sieci neuronowych w prognozowaniu mikrobiologicznym.

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiły 100-gramowe kulki mięsne przygotowane z mięsa wołowego z udźca z udziałem następujących dodatków (ilości podane w stosunku do masy mięsa): bułka tarta (10%), mleko UHT o zawartości 2% tłuszczu (10%), rozdrobniona cebula (10%), sól kuchenna (1,2%). Surowce zakupiono w sieci detalicznej.

Uformowane kulki mięsne pieczono w piekarniku elektrycznym, w temp. 150°C, do momentu osiągnięcia wewnątrz produktu temp. 75°C. Produkty stanowią model produktu mięsnego reprezentujący grupę produktów z mięsa rozdrobnionego. Produkty wykonano w warunkach laboratoryjnych, pakowano w torebki polietylenowe

(o grubości 0,66 mm, przepuszczalne dla pary wodnej – 8,96 g/m²/24 godz. ± 0,28, przepuszczalne dla tlenu – 888 cm³/m²/24 godz.) i zamykano przez zgrzewanie.

Produkty mięsne przechowywano do 16 dni w temp. 5, 10, 15 i 20°C w inkubatorze mikrobiologicznym z dochładzaniem.

Oznaczano liczbę bakterii z rodzaju *Pseudomonas* na agarze z dodatkiem selektywnego, liofilizowanego suplementu (cetrymid czwartorzędowa sól amoniowa; fucidyna, cefalosporyna – antybiotyki) – CFC, 5 ml/500 ml jałowego podłoża, firmy Noack Polen; według normy [21]. Posiew wykonywano metodą wgłębną, temp. inkubacji 22°C, czas inkubacji 72 godz.

Cały produkt (100 ± 3 g) poddawano homogenizacji w stosunku 1:1 z jałową wodą peptonową (Noack Polen) w jałowym woreczku do stomachera (Seward), (Stomacher 80) przez 60 s z prędkością standardową. Rozcieńczenie 10⁻¹ uzyskiwano przez dodanie 45 ml jałowej wody peptonowej do 5 g homogennej próby i ponowne homogenizowanie przez 60 s ze standardową prędkością (Stomacher 80). Kolejne dziesiętne rozcieńczenia uzyskiwano przez przeniesienie 1 ml do 9 ml jałowej wody peptonowej (Noack Polen).

Na płytki Petriego wylewano po 0,2 ml zawiesiny bakteryjnej. Posiewano z trzech kolejnych rozcieńczeń (w zależności od oczekiwanego poziomu skażenia produktu) w dwóch powtórzeniach. Zalewano płytki rozplynnionym, ostudzonym agarem, mieszano i pozostawiano do inkubacji. Do liczenia wybierano płytki zawierające od 15 do 300 kolonii [22].

W opracowaniu zastosowano funkcje matematyczne pozwalające na ocenę wpływu temperatury na parametry wzrostu.: funkcje sigmoidalne – modyfikowana funkcja Gompertza i logistyczna (1) i (2); liniowa funkcja Conline'a (3), funkcja Ratkowsky'ego (4), funkcje wielomianowe (5).

$$\text{Log } N_{(t)} = A + \frac{D}{1 + \exp\{-B(t - M)\}} \quad (1)$$

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

gdzie: t – czas [h], N_(t) – gęstość populacji w czasie t [log (jtk/ml)], A – wartość dolnej asymptoty (np. Log N_(-∞)) [log (jtk/ml)], D – różnica pomiędzy górną i dolną wartością asymptoty [np. Log N_(∞) - Log N_(-∞)] [log (jtk/ml)], M – czas, po którym wykładnicza szybkość wzrostu jest maksymalna [h], B - oznacza tangens kąta nachylenia krzywej wzrostu w czasie M, w równaniu (1) nachylenie stycznej – BD/4, w równaniu (2) nachylenie stycznej – BD/e.

Do opracowania pierwszorzędowych modeli liniowych rozwoju i przeżywalności drobnoustrojów w modelowych produktach mięsnych zastosowano model Conline'a opracowany przez Einarssona [5, 6]:

$$Y = \begin{cases} a_n & X \leq c_n \\ a_n + b_n(X + c_n) & X \geq c_n \end{cases} \quad (3)$$

gdzie: Y – $\log N$ jtk/g, X – czas przechowywania (dni) = τ , a_n , b_n , c_n , – stałe, przy czym: a_n – w przybliżeniu odpowiada logarytmowi początkowej liczby bakterii w 1 g = N_0 ; b_n – nachylenie krzywej wzrostu (współczynnik szybkości wzrostu = k); c_n – czas trwania lag fazy.

Jeżeli $c_n = 0$ to równanie przyjmuje postać:

$$\log N = \log N_0 + k\tau \quad (3a)$$

Model Ratkowsky'ego przedstawia równanie (4):

$$\sqrt{k} = (-) \quad (4)$$

T – temp. inkubacji [$^{\circ}\text{C}$], k – stała szybkości wzrostu, T_{min} – minimalna temperatura wzrostu [$^{\circ}\text{C}$], b – parametr do dopasowania.

Pierwiastek względnej szybkości wzrostu wyrażono jako funkcję przyrostu \log liczby drobnoustrojów oraz przyrostu temperatury przechowywania [$\sqrt{k} = \frac{\Delta Y}{\Delta X^2}$].

Wykorzystano dwuparametrowy model Ratkowsky'ego z przeznaczeniem do temperatur suboptymalnych. Zastosowanie modelu czteroparametrowego było niemożliwe ze względu na zbyt małą liczbę stopni swobody przy szacowaniu parametrów.

Do utworzenia modelu powierzchni odpowiedzi zastosowano funkcje wielomianowe drugiego i trzeciego stopnia. Ogólny wzór funkcji przedstawia równanie (5):

$$\ln Y = a + b_1S + b_2T + b_3P + b_4S^2 + b_5T^2 + b_6P^2 + b_7ST + b_8SP + b_9TP + e \quad (5)$$

gdzie: $a, b_{1,2,\dots}$ – są parametrami do oszacowania, S, T, P – zmienne niezależne, e – błąd. Szacowania parametrów funkcji s-kształtnych dokonano z użyciem procedur iteracyjnych wyznaczających najmniejszą wartość sumy kwadratów różnicy błędu pomiędzy wartościami empirycznymi i teoretycznymi. Do szacowania zastosowano algorytm Marquardta realizujący nieliniową MNK (Metoda Najmniejszych Kwadratów). Obliczenia wykonano w programie TableCurve 2D for Windows (AISN Software Inc). W celu porównania dopasowania modeli Gompertza i logistycznego obliczono współczynnik determinacji R^2 [10].

Szacowanie parametrów modelu Conline'a, Ratkowsky'ego oraz modelu powierzchni odpowiedzi wzrostu badanych grup drobnoustrojów wykonano klasyczną metodą najmniejszych kwadratów z użyciem pakietu statystycznego Statistica 5.5 (StatSoft Polska, Inc.) oraz TableCurve 3D for Windows (SYSTAT Software Inc).

Konfiguracja sieci neuronowej i algorytm uczenia zostały wybrane w wyniku procesu automatycznego projektowania sieci. Zastosowana sieć neuronowa realizowała regresję nieliniową pomiędzy danymi wejściowymi i wyjściowymi. Na wejście sieci wprowadzono zmienne niezależne (czas i temperaturę), na wyjście wprowadzono wartości liczby drobnoustrojów (log jtk/g). Uczenie realizował algorytm wstecznej propagacji błędów oraz algorytm gradientów sprzężonych. Proces uczenia przebiegał przy współczynniku uczenia $\alpha = 0,1$ oraz momentum 0,3.

Do realizacji zagadnienia zastosowano program Statistica Neural Networks Pl. 4.0 (StatSoft Inc.).

Wyniki i dyskusja

Pierwszorzędowe modele matematyczne

Modele pierwszorzędowe Gompertza i logistyczny rozwoju bakterii z rodzaju *Pseudomonas* były dobrze dopasowane do danych empirycznych. Dopasowanie modeli było lepsze w przypadku produktów przechowywanych w wyższej temperaturze, odpowiednio w 15 i 20°C uzyskano 79 i 70% wyjaśnienia zmienności liczby bakterii przez zmienną niezależną – czas przechowywania (rys. 1a i 1b oraz 2a i 2b).

Opracowane modele pierwszorzędowe były znacznie słabiej dopasowane do danych empirycznych w przypadku produktów przechowywanych w temp. 5 i 10°C, odpowiednio 27 i 47%. Dobre dopasowanie modelu Gompertza wymaga danych charakteryzujących wzrost poniżej i powyżej punktu przegięcia krzywej sigmoidalnej – M. Prawdopodobnie dane empiryczne liczby drobnoustrojów w produktach mięsnych przechowywanych w temp. 5 i 10°C zawierały punkty tylko z jednego z segmentów krzywej sigmoidalnej [16].

W tab. 1. przedstawiono modele liniowe Conline'a rozwoju bakterii *Pseudomonas* występujących w modelowych produktach mięsnych. W temp. 15 i 20°C były one najlepiej dopasowane do danych empirycznych, $R^2 = 76\%$ i $R^2 = 68\%$. Natomiast w temp. 5°C dopasowanie funkcji regresji do danych empirycznych wynosiło tylko 16%. Sugeruje to nieliniowy przebieg szacowanych parametrów. Najlepszy liniowy model wzrostu bakterii z rodzaju *Pseudomonas* uzyskano w przypadku produktów przechowywanych w temp. 15°C.

Tabela 1

Modele liniowe Conline'a wzrostu bakterii *Pseudomonas* w produktach mięsnych przechowywanych w zróżnicowanej temperaturze.

Conline linear models of the *Pseudomonas* bacteria growth in meat products stored at different temperatures.

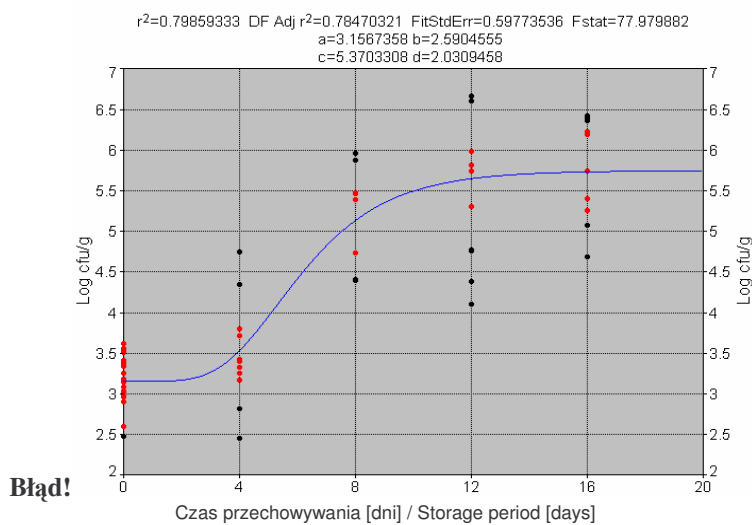
Temperatura przechowywania Temperature of storage [°C]	Model / Model	r(x,y)	R ²	t	p	N
---	---------------	--------	----------------	---	---	---

5	$\text{Log } N = 3,34 + 0,05\tau$	0,40	0,16	3,34	0,001	62
10	$\text{Log } N = 3,28 + 0,15\tau$	0,68	0,46	7,74	0,000	71
15	$\text{Log } N = 3,14 + 0,18\tau$	0,87	0,76	13,87	0,000	63
20	$\text{Log } N = 3,30 + 0,21\tau$	0,82	0,68	12,14	0,000	72

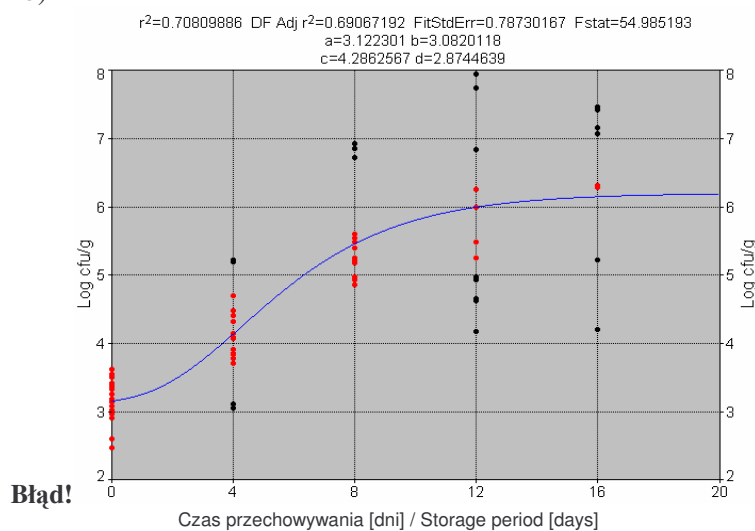
Objaśnienia: / Explanatory notes:

r - współczynnik korelacji Pearsona / r - Pearson correlation factor; R^2 - współczynnik determinacji / determination coefficient; t - statystyka t-Studenta / t - Student value; p - poziom istotności / level of significance; N - liczebność grupy / group size.

a)



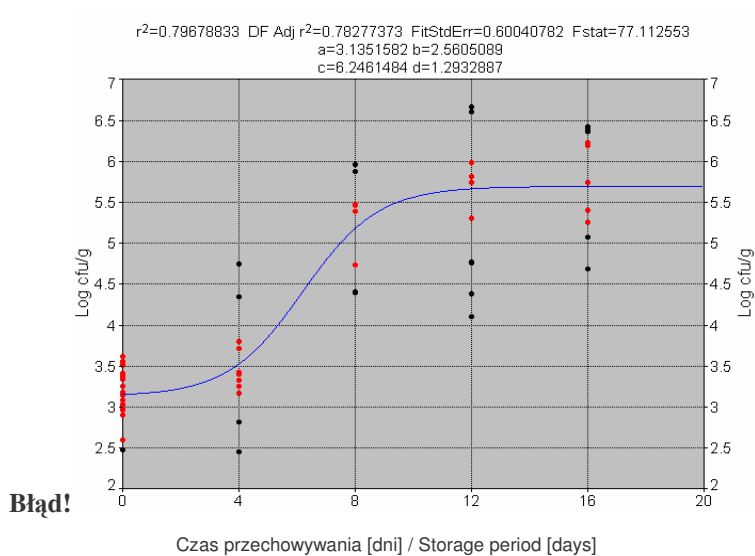
b)



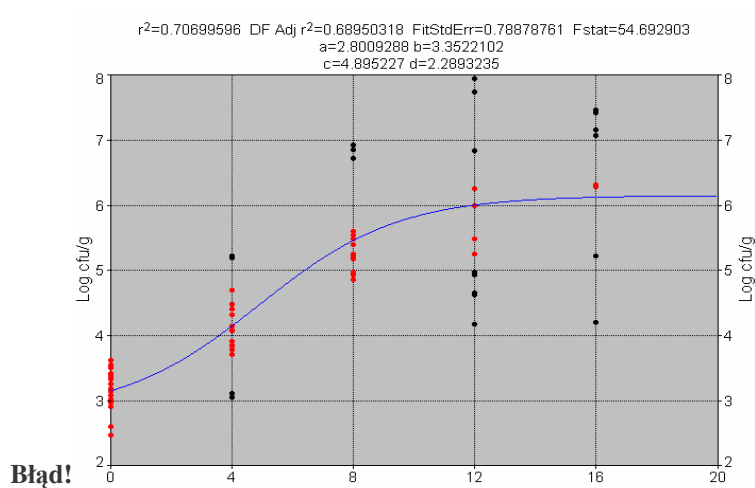
Rys. 1. Modele Gompertza wzrostu bakterii *Pseudomonas* [log jtk/g] w produktach mięsnych przechowywanych w temp.: a) 15°C, b) 20°C.

Fig. 1. Gompertz models of the *Pseudomonas* bacteria growth [log cfu/g] in meat products stored at temperatures: a) 15°C, b) 20°C.

a)



b)



Czas przechowywania [dni] / Storage period [days]

Rys. 2. Modele logistyczne wzrostu bakterii *Pseudomonas* [log jtk/g] w produktach mięsnych przechowywanych w temp. a) 15°C, b) 20°C.

Fig. 2. Logistic models of the *Pseudomonas* bacteria growth [log cfu/g] in meat products stored at temperatures: a) 15°C, b) 20°C.

Model Ratkowsky'ego jest jednym z modeli wyrażających wpływ temperatury na względną szybkość wzrostu drobnoustrojów. Modyfikacje tego modelu uwzględniają również wpływ temperatury na długość trwania lag fazy [9, 17]. Model ten jest często i z powodzeniem stosowany ze względu na fakt, że temperatura jest zwykle najważniejszym czynnikiem wpływającym na wzrost drobnoustrojów w żywności [7, 8, 17, 18, 19].

Wyznaczono współczynniki szybkości wzrostu w kolejnych dniach oznaczeń w przypadku badanych grup drobnoustrojów występujących w modelowych produktach mięsnych przechowywanych w temp. od 10 do 20°C (tab. 2). Ze względu na brak oznaczeń liczby drobnoustrojów w temp. 0°C (log jtk/g) nie uzyskano wyników \sqrt{k} w przypadku przechowywania modelowych produktów mięsnych w temp. 5°C (brak przyrostów ΔY i ΔX).

Tabela 2

Względna szybkość wzrostu bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w modelowych produktach mięsnych przechowywanych w zróżnicowanej temperaturze (model Ratkowsky'ego).

Relative growth rate of the *Pseudomonas* bacteria in meat products stored at different temperatures (Ratkowsky model)

Temperatura przechowywania Temperature of storage [°C]	\sqrt{k}				
	Dni oznaczeń mikrobiologicznych Days on which microbiological determinations were performed				
	0	4	8	12	16
5	-	-	-	-	-
10	0,0000	0,2388	0,3756	0,3755	0,6176
15	0,0000	-	0,2535	0,3440	0,2305
20	0,0000	0,3525	0,2659	0,2564	0,3207

Szybkość wzrostu bakterii *Pseudomonas* występujących naturalnie w modelowych produktach mięsnych była największa w 16. dniu oznaczeń w produktach przechowywanych w temp. 10°C (tab. 2).

W badaniach Giannuzzi i wsp. [9] otrzymano wartość współczynnika szybkości wzrostu bakterii *Pseudomonas* spp. równą 0,62 w czasie przechowywania próbek surowej wołowiny w temp. 4°C. Podobne obliczenia z wykorzystaniem

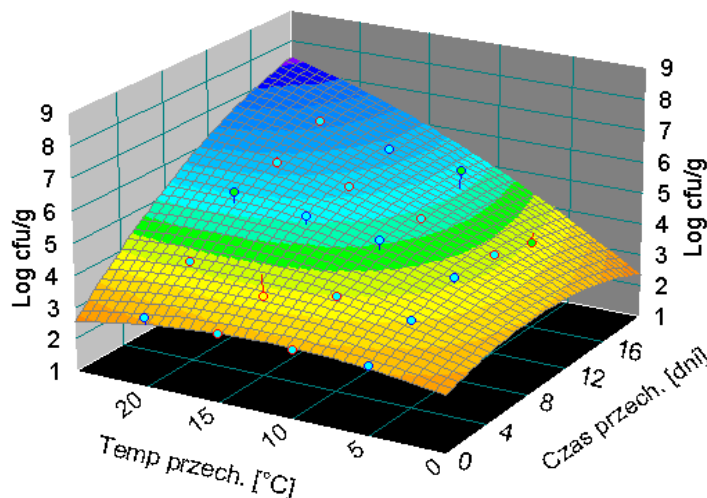
zmodyfikowanego modelu Ratkowsky'ego przeprowadzone przez Muermansa i wsp. [17] wykazały szybkość wzrostu bakterii *Pseudomonas spp.* równą 0,12 w temp. 9,4°C. Szybkość wzrostu *Ps. putida* wynosiła 0,50 w temp. 10°C [18].

W wyższej temperaturze przechowywania współczynnik szybkości wzrostu bakterii *Pseudomonas* był niższy, co może być powodowane przez szybszy wzrost względnych mezofili, a także brak przystosowań bakterii *Pseudomonas* do wzrostu w wyższych zakresach temperatury. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem najszybciej rosnących szczepów (*Pseudomonas putida* 1442, GT = 3,3 godz.) w szerokim zakresie temperatury wykazały, że *Pseudomonas spp.* jest rodzajem dominującym tylko w niskiej temperaturze. Za zepsucie żywności w temp. 15–20°C odpowiedzialne są inne mikroorganizmy [19].

Modele powierzchni odpowiedzi utworzono wyrażając log jtk/g (z) w funkcji czasu (x) i temperatury (y) przechowywania. Zastosowano funkcje wielomianu drugiego i trzeciego stopnia wykorzystywane przez innych autorów do określenia wpływu kilku niezależnych czynników na parametry kinetyczne wzrostu drobnoustrojów [1, 13, 15].

$$\text{Eqn 301 } z = a + bx + cy + dx^2 + ey^2 + fxy$$

$r^2 = 0.93469448$ DF Adj $r^2 = 0.90455347$ FitStdErr = 0.31414737 Fstat = 40.075393
 $a = 2.7637742$ $b = 0.12663635$ $c = 0.080566817$
 $d = -0.007339494$ $e = -0.0035690331$ $f = 0.010635143$



Rys. 3. Model wielomianowej powierzchni odpowiedzi (stopnia 2) wzrostu bakterii *Pseudomonas* w produktach mięsnych.

Fig. 3. The model of polynomial response surface (second degree) of the *Pseudomonas* bacteria growth in meat products.

Objaśnienia: / Explanatory notes:

z - log liczby *Pseudomonas* [jtk/g] / log plate count of *Pseudomonas* bacteria [cfu/g]; x - czas [dni] / storage period [days]; y - temperatura / temperature; a - stała / constant; b, c, d, e - parametry funkcji

wielomianowej / parameters of the polynomial function; $r^2 = R^2$ - współczynnik determinacji / determination coefficient; $\text{adj } r^2 = \text{adj } R^2$ - zrewidowany współczynnik determinacji / revised R determination coefficient; błąd szacunku / standard assessment error; wartość statystyki F / F statistic value.

Wielomianowy model powierzchni odpowiedzi (stopnia drugiego) bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, występujących w produktach mięsnych, przedstawiono na rys. 3. Dopasowanie wielomianów (st. 2 i st. 3) wynosi odpowiednio 93 i 95%, co świadczy o bardzo dobrej jakości otrzymanych modeli. Mimo lepszego dopasowania do danych eksperymentalnych modelu wielomianowego trzeciego stopnia niż modelu wielomianowego drugiego stopnia, wyznaczone wartości reszt są większe niż w modelu o nieco gorszym dopasowaniu. Również oszacowanie parametrów modelu wielomianowego drugiego stopnia (tab. 3) jest w przypadku większości zmiennych statystycznie istotne, co oznacza istotny wpływ szczególnie czasu przechowywania na liczbę bakterii *Pseudomonas* (tab. 4).

W tabeli 3. i 4. przedstawiono dane prognozowane wzrostu bakterii *Pseudomonas* w modelowych produktach mięsnych w trakcie przechowywania w zróżnicowanej temperaturze. Wielomian st. 3 szacuje ujemną wartość log jtk/g w 20. dniu przechowywania produktów mięsnych w temp. 0°C. Jest to szczególnie zastanawiające w przypadku bakterii psychrotrofowych, które w warunkach chłodniczych wykazują powolny wzrost. Wielomian stopnia drugiego nie przewiduje wartości ujemnej, ale właśnie powolny, sukcesywny rozwój naturalnie występujących w produktach mięsnych bakterii z rodzaju *Pseudomonas*.

Tabela 3

Liczba bakterii z rodzaju *Pseudomonas* [log jtk/g] w produktach mięsnych (dane ekstrapolowane do 20. dnia przechowywania, w temp. 0 i 25°C) (Model powierzchni odpowiedzi 2. stopnia).
The count of *Pseudomonas* bacteria [log cfu/g] in meat products (the data extrapolated till the 20th day of storage at temperatures of 0°C and 25°C) (Second-degree model of response surface).

Wielomian stopnia 2. Second degree poly-nominal	x = dni / x = days					
y = temperatura y = temperature	0	4	8	12	16	20
0	2,76	3,15	3,30	3,22	2,91	2,36
5	3,07	3,67	4,04	4,17	4,07	3,73
10	3,21	4,02	4,60	4,95	5,06	4,93
15	3,16	4,19	4,98	5,54	5,86	5,95
20	2,94	4,18	5,19	5,96	6,49	6,79
25	2,54	3,99	5,21	6,20	6,94	7,46

Można sądzić, że prognozowanie liczby bakterii z rodzaju *Pseudomonas* z wykorzystaniem modelu wielomianowego drugiego stopnia jest bardziej odpowiednie. Baranui i wsp. [2]. podkreślają, że w przypadku modeli opracowywanych na potrzeby przetwórstwa żywności należy zastosować te, które najlepiej przewidują niezależne wyniki, a nie te, które są najlepiej dopasowane do danych użytych do ich generowania.

Tabela 4

Liczba bakterii z rodzaju *Pseudomonas* [log jtk/g] w produktach mięsnych (dane ekstrapolowane do 20. dnia przechowywania, w temp. 0 i 25°C) (Model powierzchni odpowiedzi 3. stopnia).

The count of *Pseudomonas* bacteria [log cfu/g] in meat products (the data extrapolated till the 20th day of storage at temperatures of 0°C and 25°C) (Third-degree model of response surface model).

Wielomian stopnia 3. Third-degree poly-nominal	x = dni / x = days					
y = temperatura y = temperature [°C]	0	4	8	12	16	20
0	2,20	2,18	1,95	1,45	0,56	-0,77
5	3,20	3,70	4,03	4,10	3,81	3,07
10	3,16	4,02	4,73	5,19	5,32	5,03
15	2,90	3,94	4,85	5,54	5,91	5,88
20	3,21	4,26	5,20	5,93	6,37	6,43
25	4,88	5,77	6,56	7,17	7,50	7,47

Stosując model powierzchni odpowiedzi należy pamiętać o jego empirycznym charakterze. Powodzenie predykcji na jego podstawie jest uzależnione od zastosowanych danych. Ponadto w przypadku ekstrapolacji poza obszar danych eksperymentalnych, szczególnie w przypadku funkcji wielomianu wyższego rzędu, który z reguły jest lepiej dopasowany do danych, zachodzi ryzyko generowania wyników nierzeczywistych. Z danych literaturowych wynika, że zastosowanie nowego czynnika środowiskowego determinującego wzrost (np. NaNO₂) powoduje dwukrotny wzrost ryzyka nieprawidłowej ekstrapolacji [2, 14, 15].

Uruchomiono ST Neural Networks dla całego zbioru wyników ogólnej liczby bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. Zbiór 268 przypadków został podzielony w stosunku 2:1:1 odpowiednio na zbiory uczący, walidacyjny i testowy 129:65:65. Przetestowano 52 sieci. Sieci najlepszej jakości do rozwiązywania badanego zagadnienia to jednokierunkowe sieci wielowarstwowe (MLP).

Sieć 2:2-3-1:1 zbudowana z pięciu warstw: dwa neurony w warstwie wejściowej, dwa w pierwszej warstwie ukrytej, trzy w drugiej warstwie ukrytej i jeden w trzeciej warstwie ukrytej oraz jeden w warstwie wyjściowej (rys. 4).

Sieć zbudowana z sześciu warstw 2:10-7-1-1: dwa neurony w warstwie wejściowej, dziesięć w pierwszej warstwie ukrytej, siedem w drugiej warstwie ukrytej po jednym w trzeciej i czwartej warstwie ukrytej oraz jeden w warstwie wyjściowej (rys. 5).

Tabela 5

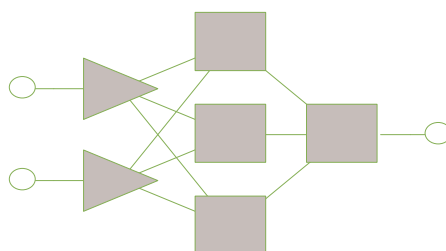
Dane charakteryzujące sieć MLP 2:2-3-1:1 do prognozowania bakterii *Pseudomonas*.

Data characterizing the MLP 2:2-3-1:1 net, applied for the purpose of developing a *Pseudomonas* bacteria prognosis.

Miara statystyczna Statistical measure	Zbiór uczący Learning file	Zbiór walidacyjny Validation file	Zbiór testowy Test file
\bar{x}	4,30	4,33	4,09
s	1,21	1,40	1,29
\bar{e}	0,00	0,01	0,09
se	0,75	0,87	0,72
$ e $	0,55	0,63	0,55
se/e	0,62	0,62	0,56
r^2	0,78	0,78	0,82

Objaśnienia: / Explanatory notes:

\bar{x} - wartość średnia / mean value; s – odchylenie standardowe / standard deviation; \bar{e} średni błąd / mean error; se - odchylenie błędu / deviation of error; $|e|$ - średni błąd bezwzględny / absolute mean error; se/e - iloraz odchyień / quotient of deviations; r - współczynnik korelacji Pearsona / r - Paerson correlation factor.



Rys. 4. Schemat sieci MLP 2:2-3-1:1 do prognozowania bakterii *Pseudomonas*.

Fig. 4. Scheme of the MPL 2:2-3-1:1 net applied for the purpose of developing a *Pseudomonas* bacteria prognosis

Do oceny jakości sieci bierze się pod uwagę iloraz odchyleń standardowych wyznaczonych dla błędów i danych. Iloraz ten wskazuje, czy próba budowy modelu regresyjnego się powiodła. Niższa od 1,0 wartość wspomnianego ilorazu świadczy o lepszym oszacowaniu wyjścia systemu, uzyskiwanym za pomocą sieci. Im niższa wartość – tym lepiej model “zgaduje” nieznane wartości wyjściowe. Ponadto obliczany jest standardowy współczynnik korelacji Pearsona pomiędzy obliczonymi i rzeczywistymi wartościami wyjściowymi. Współczynnik korelacji równy 1,0 niekoniecznie oznacza idealną prognozę (a tylko prognozę, która jest dokładnie liniowo skorelowana z aktualnymi wartościami wyjściowymi), jakkolwiek w praktyce współczynnik korelacji jest dobrym wskaźnikiem jakości sieci.

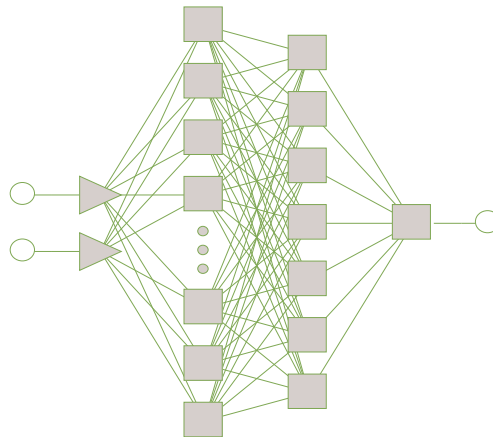
Tabela 6

Dane charakteryzujące sieć MLP 2:10-7-1:1 do prognozowania bakterii *Pseudomonas*.

Data characterizing the MLP 2:10-7-1:1 net, applied for the purpose of developing a *Pseudomonas* bacteria prognosis.

Miara statystyczna Statistical measure	Zbiór uczący Learning file	Zbiór walidacyjny Validation file	Zbiór testowy Test file
\bar{x}	4,30	4,33	4,09
s	1,21	1,40	1,29
\bar{e}	0,00	0,01	0,10
se	0,75	0,86	0,74
$ e $	0,55	0,61	0,58
se/e	0,62	0,61	0,57
r^2	0,78	0,78	0,81

Objaśnienia jak w tab. 5. / Explanatory notes as in Tab. 5



Rys. 5. Schemat sieci MLP 2:10-7-1:1 do prognozowania bakterii *Pseudomonas*.

Fig. 5. Scheme of the MPL 2:10-7-1:1 net, applied for the purpose of developing a *Pseudomonas* bacteria prognosis.

Jakość sieci, której iloraz odchyłeń wynosi powyżej 0,7 dyskwalifikuje stworzony przez sieć model. Jakość uzyskanych modeli neuronowych prognozujących liczbę bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, przy wysokiej korelacji wartości obliczonych i zadanych, jest na poziomie 0,62 i 0,61. Wysoka wartość ilorazu odchyłeń może być wytłumaczona tym, że zbiór przypadków wykorzystywany do tworzenia i uczenia sieci był zbyt mały (268 przypadków).

Podjęte próby zastosowania sieci neuronowych doprowadziły do zadowalających rezultatów szczególnie w przypadku sieci dotyczących ogólnej liczby drobnoustrojów. Uzyskany współczynnik jakości sieci to 0,44, przy zbiorze 527 przypadków. Wydaje się więc, że przeprowadzenie odpowiednio zaplanowanego badania mikrobiologicznego pozwoli na prognozowanie rozwoju bakterii *Pseudomonas* z wykorzystaniem sieci neuronowych.

Wnioski

1. Wyniki badań umożliwiły dopasowanie modeli Gompertza i logistycznych, dobrze opisujących rozwój drobnoustrojów w produktach z mięsa rozdrobnionego, w czasie przechowywania, w zróżnicowanej temperaturze, natomiast modele liniowe nie były wystarczająco dobrze dopasowane.
2. Model Ratkowsky'ego okazał się najbardziej przydatny do oszacowania współczynnika szybkości wzrostu bakterii *Pseudomonas*.

3. Wielomiany drugiego stopnia były najbardziej odpowiednie do opisu, w postaci powierzchni odpowiedzi, wpływu dwóch zmiennych na rozwój bakterii *Pseudomonas*.
4. Wykorzystanie sieci neuronowych jest możliwe przy założeniu odpowiedniego schematu doświadczenia gwarantującego dostateczną liczbę przypadków.

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, **7**, **3**, 121-128.
- [2] Baranyi J., Ross T., McMeekin T.A., Roberts T.A.: Effect of parameterization on performance of empirical models used in predictive microbiology. *Food Microbiol.*, 1996, **13**, **1**, 83-91.
- [3] Borch E., Kant-Muermans M-L., Blixt Y.: Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, 1996, **33**, **1**, 103-120.
- [4] Chan W.K.M., Joo S-T, Faustman C., Sun Q, Vieth R: Effect of *Pseudomonas fluorescens* on beef discoloration and oxymyoglobin oxidation in vitro. *J. Food Prot.*, 1998, **61**, **10**, 1341-1346.
- [5] Einarsson H.: Predicting the shelf life of cod (*Gadus morhua*) fillets stored in air and modified atmosphere at temperatures between -4°C and +16°C; In Huss H.H., Jakobsen M., Liston J., (ed): *Quality Assurance in the Fish Industry*, Elsevier, Amsterdam 1992, pp.479-488.
- [6] Einarsson H.: Evaluation of a predictive model for the shelf life of cod (*Gadus morhua*) fillets in two different atmospheres at varying temperatures. *Int. J. Food Microbiol.*, 1994, **24**, **1/2**, 93-102.
- [7] Fu B., Labuza T.P.: Shelf life prediction: theory and application. *Food Control*, 1993, **4**, **3**, 125-132.
- [8] Fu B., Taoukis P.S., Labuza T.P.: Predictive Microbiology for monitoring spoilage of dairy products with time-temperature integrators. *J. Food Sci.* 1991, **56**, **5**, 1209-1215.
- [9] Giannuzzi L., Pinotti A., Zaritzky N.: Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998, **39**, **1-2**, 101-110.
- [10] Goryl A., Jędrzejczyk Z., Kukuła K., Osiewalski J., Walkosz A.: *Wprowadzenie do ekonometrii w przykładach i zadaniach*. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa 1996.
- [11] Jay J.M.: *Spoilage of fresh and processed Meats, Poultry and Seafood*, in *Modern Food Microbiology*. Chapman & Hall, Fourth Edition. New York 1992.
- [12] Lebert I., Begot A., Lebert A.: Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5,8-7,0), water activity (0,97-1,00) and temperature. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998, **39**, **1-2**, 53-60.
- [13] Lebert I., Robles-Olvera V., Lebert A.: Application of poly-nominal models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas spp.* and *Listeria* in meat. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, **61**, **1**, 27-39.
- [14] Masana M.O., Baranyi J.: Adding new factors to predictive models: the effect on the risk of extrapolation. *Food Microbiol.*, 2000, **17**, 367-374.
- [15] McClure P.J., Cole M.B., Davies K.W.: An example of the stages in the development of a predictive mathematical model for microbial growth: the effects of NaCl, pH and temperature on the growth of *Aeromonas hydrophila*. *Int. J. Food Microbiol.*, 1994, **23**, **3-4**, 359-375.
- [16] McMeekin T.A., Olley J.N., Ross T., Ratkowsky D.A.: *Predictive microbiology, theory and application*, RST LTD, England 1993.
- [17] Muermans M.L.T., Stekelenburg F.K., Zwietering M.H., Huis in't Veld J.H.J.: Modelling of the microbiological quality of meat. *Food Control*, 1993, **4**, **4**, 216-221.

- [18] Nemeyer K., Ross T., McMeekin T.A.: Development of a predictive model to describe the effects of temperature and water activity on the growth of spoilage *Pseudomonas*. Int. J. Food Microbiol., 1997, **38**, **1**, 45-54.
- [19] Neumeyer K., Ross T., Thomson G., McMeekin T.A.: Validation of a model describing the effects of temperature and water activity on the growth of psychotrophic *Pseudomonas*. Int. J. Food Microbiol., 1997, **38**, **1**, 55-63.
- [20] Ockerman R.W., Kim J.G.: Influence of previous bacterial growth on the biochemical and microbiological properties of beef extract medium. 38th International Congress of Meat Science and Technology, Clermont-Ferrand, France 1992.
- [21] PN-ISO 13720:1999. Oznaczanie liczby bakterii z rodzaju *Pseudomonas*.
- [22] PN-A-82055-6:1994. Oznaczanie ogólnej liczby drobnoustrojów.

GROWTH MODELS OF THE *PSEUDOMONAS* BACTERIA IN READY-TO-EAT PRODUCTS

S u m m a r y

The objective of the paper was to construct mathematical bacteria growth models of the *Pseudomonas spp.* bacteria occurring in model meat products considering the two following factors: time and temperature. For the purpose of the investigations performed, there was used a 'model' of the meat product representing a group of meat products made of minced meat.

The investigation results obtained made it possible to construct first-order Gompertz and logistic models which appropriately described the growth of bacteria in minced meat products during their storage at various temperatures. The constructed Conline linear models were not sufficiently matching. The second-degree Ratkowsky model appeared to be the most suitable for the purpose of assessing the growth rate of the groups of microorganisms. The second-degree poly-nominals appeared to be the most suitable to describe, in the form of response surfaces, the effect of two variables on the growth of selected groups of microorganisms in meat products. Additionally, an attempt was made to apply this new tool, i.e. neural networks, to microbiological prognoses.

Key words: meat products, microbiology, prognostic models 