

ELŻBIETA ROSIAK, DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA

ZASTOSOWANIE METOD PROGNOZOWANIA MIKROBIOLOGICZNEGO DO MODELOWANIA WZROSTU MIKROFLORY SAPROFITYCZNEJ W PRODUKTACH MIĘSNYCH UTRWALONYCH LIZOZYMEM W FORMIE DIMERU

Streszczenie

Celem badań było opracowanie matematycznych modeli wzrostu ogólnej liczby drobnoustrojów oraz saprofitycznych bakterii z rodzaju *Pseudomonas spp.* w modelowych produktach mięsnych utrwalonych lizozymem. Badania mikrobiologiczne wykonano klasycznymi metodami płytkowymi. Do uzyskanych danych empirycznych dopasowano funkcje s-kształtne (Gomperta i logistyczna) 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

Mikrobiologia prognostyczna prezentuje nowe podejście do zapewniania jakości i bezpieczeństwa żywności [10, 21]. Możliwości zastosowania wyników prognozowania jest kilka np. przewidywanie przydatności i bezpieczeństwa zdrowotnego spożywanej żywności, możliwość wprowadzania zmian w recepturach, opracowywanie nowych produktów czy stosowanie nowych technologii z uwzględnieniem limitów krytycznych parametrów w krytycznych punktach kontrolnych HACCP, oszacowanie wymagań bezpieczeństwa, określenie konsekwencji błędnie przeprowadzonego procesu produkcji czy przechowywania.

W pracy badano rozwój bakterii *Pseudomonas* w produktach mięsnych utrwalo-nych naturalnym konserwantem lizozymem. Rodzaj *Pseudomonas spp.* wywołuje psu-cie żywności powodując znaczne jej straty. Lizozym stanowi naturalny konserwant wykorzystywany do utrwalania mięsa, ryb, serów dojrzewających, owoców morza, jak również warzyw i owoców. W badaniach prowadzonych przez Kijowskiego i wsp. [9, 11] wykazano możliwość wykorzystania lizozymu do przedłużania trwałości mięsa drobiowego. Wobec tendencji ograniczania w produkcji żywności chemicznych sub-stancej konserwujących oraz preferencji konsumentów do produktów naturalnych mi-nimalnie przetworzonych podjęto próbę wykorzystania lizozymu do utrwalania pro-duktów mięsnych. W danych literaturowych brak jest dotychczas modeli prognostycz-nych uwzględniających zmienną jaką jest dodatek tego naturalnego konserwanta.

Celem podjętych badań było opracowanie prognostycznych modeli zepsucia mo-delowych produktów mięsnych, wywoływanego przez bakterie z rodzaju *Pseudomo-nas spp.* z uwzględnieniem czynników zewnętrznych tj. czasu, temperatury, dodatku substancji konserwującej.

Praca jest częścią badań prowadzonych od kilku lat przez zespół Zakładu Techni-ki i Higieny Żywności SGGW, mających doprowadzić do opracowania sytemu eks-perckiego, uwzględniającego wpływ różnych czynników środowiskowych na parame-try kinetyczne wzrostu, przeżywalności i inaktywacji różnych grup drobnoustrojów występujących w produktach z mięsa mielonego, gotowych do spożycia.

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiły 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.

Z mięsa usuwano tkankę łączną i nadmiar tłuszczu, następnie mielono w wyjało-wionym gorącym powietrzem wilku laboratoryjnym. Do masy mięsnej dodawano po-zostałe składniki przewidziane recepturą i dokładnie mieszano. Do produktu surowego dodawano również lizozym o różnej aktywności całkowitej (1000 U/g, 10000 U/g i 25000 U/g). W masie mięsnej wykonywano zagłębienie, do którego wlewano jałową wodę peptonową (3–4 ml) oraz dodawano preparat. Całość mieszano i formowano kulki mięsne o masie 100 ± 3 g. Równocześnie prowadzono próbę kontrolną – bez lizozymu. Następnie produkty umieszczano w blaszkach i poddawano obróbce cieplnej w piekarniku elektrycznym, w temp. 150°C , do momentu osiągnięcia w środku geome-trycznym produktu temp. 70°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 – $8,96 \text{ g/m}^2/24 \text{ h} \pm 0,28$, przepuszczalne dla tlenu – $888 \text{ cm}^2/\text{m}^2/24 \text{ h}$), zamykano przez zgrzewanie i przechowywano w inkubatorach z dołączaniem przez 16 dni w temp. 10 i 20°C . Wykonano 12 powtórzeń produkcyjno-przechowalniczych modelowych produktów mięsnych w obu zakresach temperatury.

Do badań zastosowano lizozym w postaci proszku, pochodzący z Katedry Technologii Produktów Drobiarskich Akademii Rolniczej w Poznaniu. Lizozym otrzymano metodą chromatografii jonowymiennej. Preparat przechowywano w temp. -18°C .

Enzym dodawano w trzech różnych ilościach, odpowiednio: 6,2 mg, 61,1 mg i 155,2 mg preparatu lizozymu na 100 g mięsa. Ilości dodanego enzymu (mg/100g) zostały ustalone tak, aby osiągnąć odpowiednio aktywność całkowitą enzymu w próbce na poziomie: 1 000, 10 000 i 25 000 jednostek aktywności U na 1g mięsa.

Aktywność antymikrobiologiczna lizozymu warunkowa jest jego odmianą konformacyjną. Enzym w postaci monomerycznej wykazuje ograniczone oddziaływanie na bakterie G(-) ze względu na obecność zewnętrznej błony cytoplazmatycznej. Dane literaturowe wskazują, że lizozym tworzy kompleksy z substancjami aktywnymi w stosunku do bakterii G(-) przez co rozszerza się zakres jego aktywności mikrobiologicznej [5, 6]. Inną metodą jest ogrzewanie preparatu w podwyższonej temperaturze, co wywołuje nieodwracalny efekt dimeryzacji cząsteczek enzymu. W pracy enzym poddawano obróbce cieplnej w temp. 150°C przez 25 ± 3 min do momentu osiągnięcia w środku geometrycznym produktu temp. 70°C . Zastosowano enzym o aktywności 16 100 U/g. W środowisku produktu mięsnego – temp. 70°C , pH lekko kwaśne (5,7) – powstało około 30% dimeru enzymu [12]. Enzym w postaci dimeru charakteryzuje się obniżoną aktywnością hydrolityczną, ale pojawia się dodatkowa, specyficzna aktywność przeciwko bakteriom G(-), bez większej utraty aktywności przeciwko bakteriom G(+) [7, 8, 12].

Ogólną liczbę drobnoustrojów (OLD) w jtk/g oznaczano na agarze odżywczym (Noack Polen), według PN-A-82055-6:1994 [19] 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 godz. Do liczenia wybierano płytki zawierające od 15 do 300 kolonii.

Liczbę bakterii z rodzaju *Pseudomonas* (LBPs) oznaczano na agarze z dodatkiem selektywnego, liofilizowanego suplementu (cetrymid – czwartorzędowa sól amonowa; fucidyna, cefalosporyna – antybiotyki) – CFC, 5 ml/500 ml jałowego podłoża, firmy Noack Polen, według normy PN-ISO 13720:1999 [20] 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 22°C, czas inkubacji 72 godz. Do liczenia wybierano płytki zawierające od 15 do 300 kolonii.

Do opracowania pierwszorzędowych modeli matematycznych zastosowano czteroparametrowe funkcje sigmoidalne Gompertza i logistyczną [2, 15, 22, 23]. Szacowania parametrów dokonano z wykorzystaniem procedur iteracyjnych wyznaczających najmniejszą wartość sumy kwadratów błędu pomiędzy wartościami empirycznymi i teoretycznymi. Do szacowania wykorzystano algorytm Marquardta realizujący nieliniową MNK. Obliczenia wykonano w programie TableCurve 2D for Windows, AISN Software Inc. [4].

Do konstrukcji modelu powierzchni odpowiedzi zastosowano 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 oznaczeń mikrobiologicznych

Przeprowadzono doświadczenie mikrobiologiczne, którego celem było ustalenie wpływu zdenaturowanego, w wyniku ogrzewania, enzymu na ogólną liczbę bakterii oraz liczbę bakterii *Pseudomonas* występujących w produkcie mięsny. Lizozym w formie monomeru wykazuje aktywność bakteriobójczą w stosunku do bakterii G(+), bakterie G(-) ze względu na obecność membrany zbudowanej z białek, fosfolipidów oraz lipopolisacharydów nie podlegają inaktywacji. Dlatego stosowanie lizozymu jest połączone np. z fosforanem trisodowym lub EDTA [3, 14]. Inną metodą, w wyniku której następuje wzrost aktywności enzymu, jest tworzenie koniugatów z substancjami aktywnymi w stosunku do bakterii G(-). Efekt synergistyczny z lizozymem uzyskiwany jest również w wyniku działania szoku temperaturowego, chemicznego, zmian pH, działania wysokiego ciśnienia oraz termicznej denaturacji enzymu [5, 6, 7, 12, 13, 16, 17].

Wyniki oznaczeń mikrobiologicznych (OLD i LBPs) w próbie kontrolnej oraz w próbach z dodanym lizozymem, przechowywanych w temp. 10 i 20°C, przedstawiono w tab. 1. i 2.

Gotowy produkt mięsny charakteryzował się następującymi średnimi wartościami: ogólna liczba drobnoustrojów – 3,78 log jtk/g oraz liczba bakterii z rodzaju *Pseudomonas* -2,63 log jtk/g. W trakcie obróbki cieplnej odnotowano statystycznie istotną redukcję liczby drobnoustrojów, odpowiednio o 1,11 log jtk/g (OLD) i 1,95 log jtk/g (LBPs).

W temp. 10°C (tab. 1) stwierdzono statystycznie istotne niższe wartości ogólnej liczby drobnoustrojów w próbach z dodatkiem lizozymu o różnej aktywności oraz w próbie kontrolnej, w porównaniu z oznaczoną liczbą drobnoustrojów w dniu wytworzenia produktu. Sugeruje to istotny hamujący wpływ niskiej temperatury oraz dodatku

lizozymu na rozwój drobnoustrojów w produktach mięsnych. Payne i wsp. [14] zaobserwowali niższą wartość współczynnika szybkości wzrostu w niskich zakresach temperatury w przypadku *Listeria monocytogenes*, dzięki czemu lizozym miał możliwość całkowitej hydrolizy ściany komórkowej, co skutkowało szybszym efektem bakterio-bójczym.

W tab. 1. przedstawiono rozwój bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w produktach mięsnych przechowywanych w temp. 10°C. Wyniki otrzymane w 12. dniu przechowywania wykazują, że statystycznie istotne hamujące działanie wywierał dodatek lizozymu o aktywności 1 000 i 10 000 U/g. Ostatniego dnia przechowywania, w próbie kontrolnej nastąpił wzrost liczby bakterii z rodzaju *Pseudomonas* do poziomu 5,25 log jtk/g, podczas gdy dodany lizozym we wszystkich próbach spełniał rolę czynnika hamującego rozwój bakterii.

Tabela 1

Ogólna liczba drobnoustrojów (OLD) [log jtk/g] oraz liczba bakterii z rodzaju *Pseudomonas* (LBPs) [log jtk/g] w produktach z dodatkiem lizozymu o różnej aktywności.

The total plate count of microorganisms (OLD) [log cfu/g] and the total plate count of *Pseudomonas* bacteria (LBPS) [log cfu/g] in model meat products with the added lysozyme showing different activity.

Temperatura przechowywania 10°C Storing temperature of 10°C		OLD*				LBPs*			
		K	1 000 U/g	10 000 U/g	25 000 U/g	K	1 000 U/g	10 000 U/g	25 000 U/g
Czas przechowywania [dni] Storing period [days]	0	3,78 (0,56)				2,63 (0,57)			
	4	3,11 (0,60)	3,27 (0,44)	3,19 (0,44)	3,23 (0,46)	2,98 (0,41)	2,81 (0,31)	2,92 (0,52)	3,22 (0,39)
	8	3,38 (0,41)	3,15 (0,41)	3,03 (0,48)	2,88 (0,46)	3,88 (0,80)	3,44 (0,28)	3,36 (0,50)	3,76 (0,51)
	12	4,07 (0,85)	3,81 (0,28)	3,90 (0,58)	4,10 (0,56)	4,10 (0,70)	3,20 (0,36)	3,32 (0,39)	3,91 (0,57)
	16	5,18 (1,01)	4,72 (0,87)	4,70 (0,82)	4,70 (1,13)	5,25 (0,51)	3,67 (0,21)	3,94 (0,23)	4,11 (0,53)

*Wartości średnie. W nawiasach odchylenia standardowe; K – próba kontrolna.

*Mean values. The standard deviations are given in brackets; K – a control sample.

W tab. 2. przedstawiono wyniki oznaczeń drobnoustrojów w produktach przechowywanych w temp. 20°C. Po czterech dniach przechowywania nastąpił statystycznie istotny rozwój ogólnej liczby drobnoustrojów we wszystkich próbach z dodanym lizozymem o różnej aktywności oraz w próbie kontrolnej, w porównaniu z początkową liczbą drobnoustrojów w dniu wytworzenia produktów mięsnych. W tym dniu nie stwierdzono jednak statystycznie istotnych różnic pomiędzy liczbą drobnoustrojów w próbach

z dodatkiem lizozymu o różnej aktywności a próbą kontrolną. W trakcie dalszego przechowywania produktów mięsnych stwierdzono statystycznie istotne hamujące działanie lizozymu tylko w próbce zawierającej enzym o najwyższej aktywności.

Tabela 2

Ogólna liczba drobnoustrojów (OLD) [log jtk/g] oraz liczba bakterii z rodzaju *Pseudomonas* (LBPs) [log jtk/g] w produktach z dodatkiem lizozymu o różnej aktywności.

The total plate count of microorganisms (OLD) [log cfu/g] and the total plate count of *Pseudomonas* bacteria (LBPs) [log cfu/g] in model meat products with the added lysozyme showing different activity.

Temperatura przechowywania 20°C Storing temperature of 20°C		OLD *				LBPs *			
		K	1 000 U/g	10 000 U/g	25 000 U/g	K	1 000 U/g	10 000 U/g	25 000 U/g
Czas przechowywania [dni] Storing period [days]	0	3,75 (0,56)				2,63 (0,57)			
	4	5,54 (0,78)	5,48 (0,62)	5,39 (0,78)	5,21 (0,92)	3,43 (0,68)	4,26 (0,07)	5,08 (0,17)	6,18 (0,21)
	8	6,96 (0,36)	6,67 (0,41)	6,55 (0,39)	6,28 (0,64)	4,51 (1,51)	4,18 (1,54)	4,98 (0,76)	5,70 (0,28)
	12	6,92 (0,44)	6,87 (0,38)	6,90 (0,47)	6,93 (0,57)	4,63 (1,18)	3,59 (0,68)	4,53 (1,28)	4,27 (1,44)
	16	7,08 (0,49)	7,27 (0,24)	7,03 (0,67)	6,77 (0,50)	5,83 (0,90)	3,74 (0,44)	4,89 (0,48)	4,81 (0,57)

*Wartości średnie. W nawiasach odchylenie standardowe; K – próba kontrolna.

*Mean values. The standard deviations are given in brackets; K – a control sample

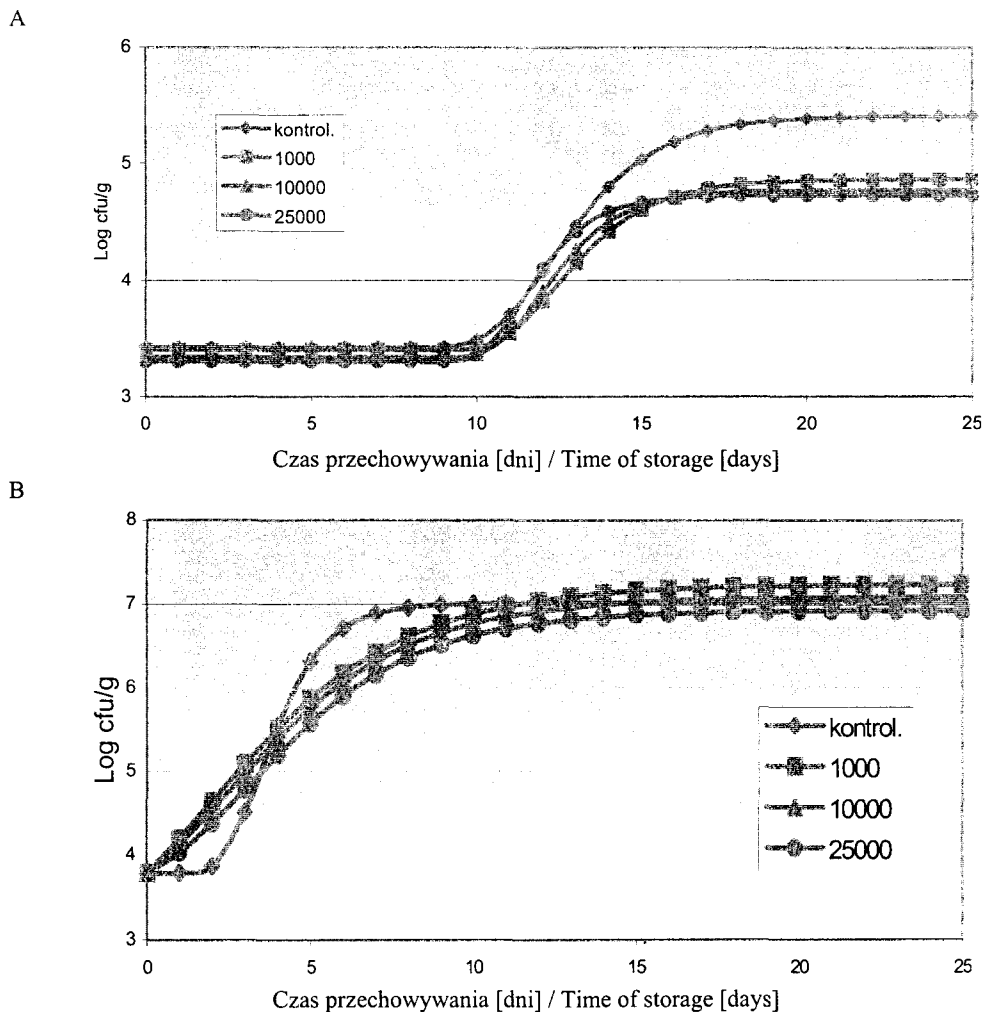
Bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, występujące w produktach mięsnych przechowywanych w temp. 20°C (tab. 2) przez 16 dni, były najefektywniej hamowane przez lizozym o aktywności 1000 U/g mięsa. Słabszy, choć nadal statystycznie istotny, hamujący efekt wywierał dodany lizozym o aktywność 10 000 U/g oraz 25 000 U/g.

Badania Masschalck i wsp. [10] wykazały, że *Pseudomonas fluorescens* jest najbardziej wrażliwy spośród badanych bakterii G(-) na działanie lizozymu zdenaturowanego poprzez wysokie ciśnienie. Zjawisko działania lizozymu nie jest jednak uniwersalne dla wszystkich bakterii G(-). Zależy w dużej mierze od interakcji pomiędzy powierzchnią komórki drobnoustrojów a strukturą cząsteczki lizozymu.

Konstrukcja modeli pierwszorzędowych

Stwierdzono, że model logistyczny opisujący rozwój ogólnej liczby drobnoustrojów oraz bakterii z rodzaju *Pseudomonas* (log jtk/g), w modelowych produktach mięsnych utrwalonych lizozymem w formie dimeru o różnej aktywności oraz w próbce kontrolnej – bez dodatku lizozymu, przechowywanych w temperaturze 10 i 20°C, cha-

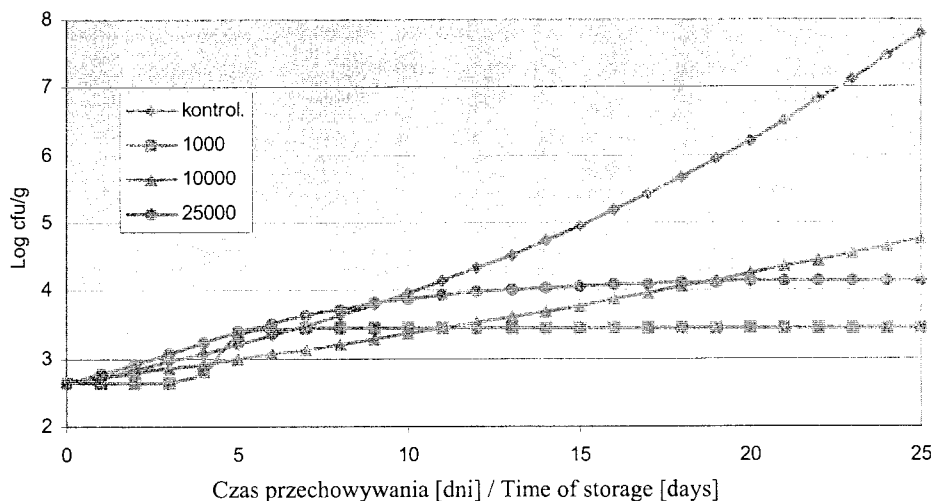
rakteryzował się niższymi współczynnikami determinacji w porównaniu z modelem Gompertza. Na rys. 1. i 2. przedstawiono modele pierwszorzędowe opracowane z wykorzystaniem funkcji Gompertza. Modele opracowano w oparciu o dane zagregowane.



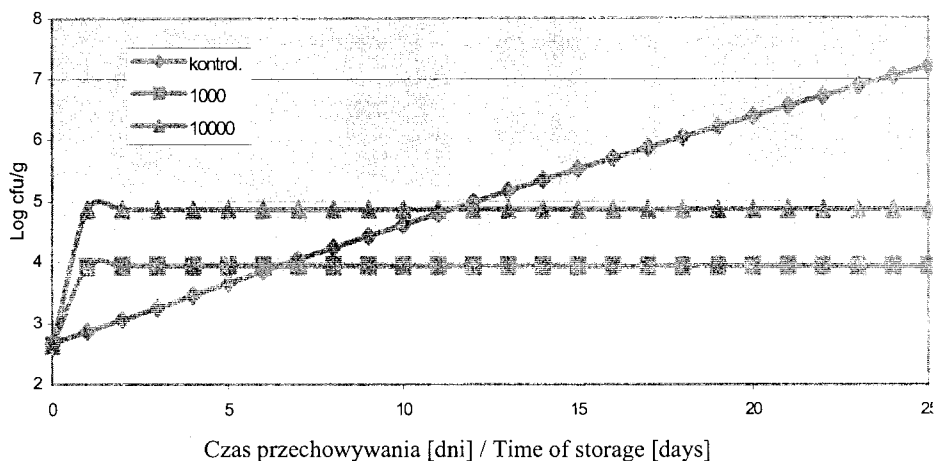
Rys. 1. Model Gompertza wzrostu OLD w modelowych produktach mięsnych utrwalonych lizozymem przechowywanych w temp. 10°C (A) i 20°C (B).

Fig. 1. The Gompertz model of growth in the OLD total count of bacteria in model meat products preserved using lysozyme and stored at temperatures of: 10°C (A), and 20°C (B).

A



B



Rys. 2. Model Gompertza wzrostu LBPs w modelowych produktach mięsnych utrwalonych lizozymem przechowywanych w temp. 10°C (A) i 20°C (B).

Fig. 2. The Gompertz model of growth in the total plate count of *Pseudomonas* bacteria in model meat products preserved using lysozyme and stored at temperatures of: 10°C (A), and 20°C (B).

Aproksymacja modeli do danych empirycznych wzrostu OLD w produktach utrwalonych lizozymem, przechowywanych w temp. 10°C, była na wysokim poziomie, R^2 wynosiło 79–85%. Natomiast modele Gompertza wzrostu liczby bakterii *Pseudomonas* w modelowych produktach mięsnych utrwalonych lizozymem, przechowywanych w tej samej temperaturze, były dopasowane w 84–99%. Zależność pomiędzy liczbą bakterii *Pseudomonas* a czasem przechowywania miała przebieg niemal liniowy. Zastosowanie

liniowego modelu nie dawało jednak tak dobrego dopasowania do danych empirycznych, jak w przypadku modeli opisanych przez funkcje sigmoidalne.

Modele wzrostu OLD oraz LBPs w próbach kontrolnych przechowywanych w temp. 10°C były dopasowane najlepiej, R^2 wynosiło 91–96%.

Współczynniki determinacji modeli opisujących rozwój OLD w próbie kontrolnej i próbach z różną aktywnością lizozymu, przechowywanych w temp. 20°C, były wysokie, co wskazuje na bardzo dobre, 99% dopasowanie funkcji do danych empirycznych. Oznacza to niemal całkowite wyjaśnienie zmienności OLD przez zmienną niezależną (czas przechowywania). Modele wzrostu ogólnej liczby bakterii *Pseudomonas* w produktach utrwalonych lizozymem o aktywności 10 000 U/g, oraz w próbie kontrolnej, charakteryzowały się najwyższym współczynnikiem determinacji. Model Gomperta w przypadku próby kontrolnej, przechowywanej w temp. 20°C, miał przebieg niemal liniowy, nie uwzględniał lag fazy, co potwierdza brak hamującego działania lizozymu.

Tabela 3

Parametry wzrostu OLD oszacowane na podstawie funkcji Gomperta i logistycznej w modelowych produktach mięsnych utrwalonych lizozymem w formie dimeru.

The kinetic parameters of growth in the total plate count as estimated on the basis of the Gompertz and logistic functions in model meat products preserved using lysozyme in the form of a dimer.

Rodzaj próby / Sample type	Temperatura przechowywania 10°C Storing Temperature of 10°C				Temperatura przechowywania 20°C Storing Temperature of 20°C			
	μ	GT	λ	N	μ	GT	λ	N
Kontrolna Control Sample	0,40	0,74	10,40	5,40	1,07**	0,28**	2,34**	7,01**
	202,06	0,001	35,27	-	1,20**	0,25**	2,75**	7,01**
1 000 U/g	0,33	0,90	10,75	4,86	0,45	0,65	0,11	7,24
	-	0,000	43,3	-	0,66	0,45	0,02	7,23
10 000 U/g	0,39	0,76	10,55	4,77	0,43*	0,68*	0,28*	7,08*
	-	0,000	42,70	-	0,61*	0,48*	0,24*	7,07*
25 000 U/g	0,45	0,66	10,20	4,72	0,41***	0,71***	0,62***	6,92***
	-	0,000	44,21	-	0,56	0,52	0,88	6,91

μ – wsp. max. szybkości wzrostu [log (jtk/g)/h]; GT – czas generacji [h]; λ – długość lag fazy [dni], N – max gęstość populacji [log jtk/g].

μ – coefficient of the maximum growth rate [log (cfu/g)/h]; GT – generation time [h]; λ – lag time [days], N – maximum density of population [log cfu/g].

– nie oszacowano parametrów funkcji.

– parameters of the function have not been estimated

0,00 < p < 0,01; ** 0,00 < p < 0,1; *** 0,05 < p < 0,1

W tab. 3. i 4. przedstawiono oszacowane, na podstawie modeli pierwszorzędowych, parametry wzrostu ogólnej liczby drobnoustrojów oraz liczby bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. Parametry charakteryzują kinetykę wzrostu populacji drobnoustrojów pod wpływem dodanego lizozymu o różnej aktywności.

Kinetyczne parametry wzrostu ogólnej liczby drobnoustrojów, w czasie przechowywania modelowych produktów mięsnych w temp. 10°C, oszacowane na podstawie funkcji logistycznej należy uznać za nieprzydatne. Natomiast parametry oszacowane z wykorzystaniem funkcji Gompertza dobrze oddają dynamikę zmian zachodzących pod wpływem lizozymu. Najniższą wartość współczynnika szybkości wzrostu oraz najdłuższy czas generacji OLD stwierdzono w produktach, do których dodano lizozym o aktywności 1 000 U/g. Oszacowany czas trwania lag fazy był bardzo zbliżony we wszystkich próbach, maksymalna gęstość populacji w próbach utrwalonych lizozymem o różnej aktywności była zbliżona i nieco wyższa w próbie kontrolnej. Dodatek lizozymu do produktów przechowywanych w temp. 20°C wpływał hamująco, niezależnie od aktywności lizozymu, na szybkość wzrostu w porównaniu z próbą kontrolną.

Tabela 4

Parametry wzrostu LBP_s oszacowane na podstawie funkcji Gompertza i logistycznej w modelowych produktach mięsnych utrwalonych lizozymem w formie dimeru.

The kinetic parameters of growth in the total plate count of *Pseudomonas* bacteria as estimated on the basis of the Gompertz and logistic functions in model meat products preserved using lysozyme in the form of a dimer.

Rodzaj próby Sample type	Temperatura przechowywania 10°C Storing Temperature of 10°C				Temperatura przechowywania 20°C Storing Temperature of 20°C			
	μ	GT	λ	N	μ	GT	λ	N
Kontrolna Control sample	1,40	0,20	48,72	282,78	0,31	0,94	-11,04	20,13
	2,93	0,1	57,67	137,43	0,43	0,69	-11,04	20,13
1 000 U/g	0,71	0,42	3,75	3,43	4,18	0,07	-0,001	3,90
	0,36	0,81	-15,43	4,44	7,68	0,03	-0,008	3,94
10 000 U/g	0,36	0,83	58,80	122,11	10,32	0,02	0,00	4,87
	0,45	0,66	-25,19	5,71	9,71	0,03	-0,001	4,87
25 000 U/g	0,15	1,88	0,19	4,15	-	-	-	-
	0,22	1,31	0,10	4,15	3,86	0,07	-0,003	5,24

μ – wsp. max. szybkości wzrostu [log (jtk/g)/h]; GT – czas generacji [h]; λ – długość lag fazy [dni], N – max gęstość populacji [log jtk/g].

μ – coefficient of the maximum growth rate [log (cfu/g)/h]; GT – generation time [h]; λ – lag time [days], N – maximum density of population [log cfu/g].

– nie oszacowano parametrów funkcji.

– parameters of the function have not been estimated.

Wzrost aktywności enzymu w próbach wpływał na wydłużenie czasu generacji i długość trwania lag fazy badanych grup drobnoustrojów.

Wzrost bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w produktach przechowywanych w temp. 10°C był hamowany przez dodatek lizozymu. Współczynnik szybkości wzrostu (malejący) oraz czas generacji (rosnący) były najkorzystniejsze przy dodatku 25 000 U/g. Wartości parametrów długości lag fazy i maksymalnej gęstości populacji nie dały podstaw do wiarygodnego wnioskowania na ich podstawie, podobnie jak parametry wzrostu BLPs w produktach przechowywanych w temp. 20°C.

Konstrukcja modeli powierzchni odpowiedzi

Modele wielomianowe powierzchni odpowiedzi uwzględniają zmiany ogólnej liczby drobnoustrojów oraz bakterii z rodzaju *Pseudomonas* (z) w modelowych produktach mięsnych pod wpływem zmiennych niezależnych: czasu (x) oraz lizozymu (y) przy ustalonej temp. przechowywania 10 i 20°C.

Na rys. 3. przedstawiono model wielomianowy stopnia drugiego rozwoju ogólnej liczby drobnoustrojów w modelowych produktach mięsnych, przechowywanych w temp. 10°C, który jest słabiej dopasowany (93%) od modelu opisanego przez wielomian stopnia trzeciego (95%). Oba modele są dopasowane bardzo dobrze do danych eksperymentalnych, jednak zastosowanie ekstrapolacji, z wykorzystaniem modelu wielomianowego stopnia trzeciego, powodowało wystąpienie tzw. „tapering effect” czyli efektu zwężania się wartości predykcji, co nie miało miejsca w przypadku modelu wielomianowego drugiego stopnia (tab. 5). „Tapering effect” jest szczególnie widoczny przy konstrukcji modeli wielomianowych w oparciu o dane odnoszące się do skrajnych temperatur lub innych czynników uwzględnionych w eksperymencie [1]. Prowadzi do nieprawidłowego prognozowania wartości.

Dopasowanie modelu wielomianowego stopnia 2. (rys. 4) rozwoju bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w produktach mięsnych, przechowywanych w temp. 10°C wynosi 75% i jest mniejsze w porównaniu z modelem stopnia 3. (88%), jednak model lepiej dopasowany ma kształt dość trudny do zinterpretowania (rys. 5).

Ekstrapolacja LBP [log jtk/g] na podstawie modelu wielomianowego stopnia 2. do 20. dnia przechowywania produktów mięsnych w temp. 10°C przez oba modele jest zbliżona (tab. 6).

Modele wielomianowe powierzchni odpowiedzi opisujące rozwój ogólnej liczby drobnoustrojów w doświadczalnych produktach mięsnych, przechowywanych w temp. 20°C, są w 98% (model stopnia 2.) i 99% (model stopnia 3.) dopasowane do danych eksperymentalnych (rys. 6).

Tabela 5

Ogólna liczba bakterii [log jtk/g] w produktach mięsnych utrwalonych lizozymem przechowywanych w temp. 10°C (dane ekstrapolowane do 20. dnia przechowywania).

The total plate count of bacteria [log cfu/g] in model meat products preserved using lysozyme stored at 10°C (the data extrapolated up to the 20th day of storing).

Czas przechowywania [dni] Storing period [days]	Aktywność lizozymu [U/g] Activity of lysozyme [U/g]			
	Kontrolna Control sample	1 000	10 000	25 000
0	3,7839	3,7697	3,6940	3,7771
4	3,2670	3,2509	3,1586	3,2141
8	3,2963	3,2784	3,1695	3,1973
12	3,8719	3,8522	3,7267	3,7268
16	4,9938	4,9722	4,8301	4,8025
20	6,6619	6,6384	6,4797	6,4245

Tabela 6

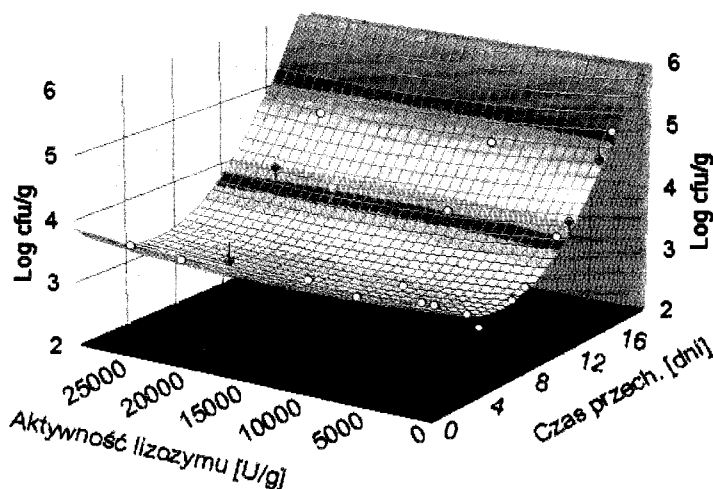
Liczba bakterii z rodzaju *Pseudomonas* [log jtk/g] w produktach mięsnych utrwalonych lizozymem przechowywanych w temp. 10°C (dane ekstrapolowane do 20. dnia przechowywania).

The total plate count of *Pseudomonas* bacteria [log cfu/g] in model meat products preserved using lysozyme stored at 10°C (the data extrapolated up to the 20th day of storing).

Czas przechowywania [dni] Storing period [days]	Aktywność lizozymu [U/g] Activity of lysozyme [U/g]			
	Kontrolna Control sample	1 000	10 000	25 000
0	2,6517	2,6075	2,4086	2,8721
4	3,0926	3,0446	2,8116	3,2182
8	3,5208	3,4690	3,2018	3,5515
12	3,9362	3,8806	3,5793	3,8721
16	4,3388	4,2794	3,9439	4,1798
20	4,7287	4,6655	4,2959	4,4748

Ekstrapolacja OLD [log jtk/g] przeprowadzona z wykorzystaniem modelu wielomianowego stopnia trzeciego (tab. 7) daje wyniki wiarygodne, tylko nieznacznie wyższe niż w przypadku modelu wielomianowego stopnia drugiego.

Eqn 301 $z=a+bx+cy+dx^2+ey^2+fx$
 $r^2=0.93605366$ DF Adj $r^2=0.90655459$ FitStdErr=0.19150016 Fstat=40.993564
 $a=3.7838896$ $b=-0.1975082$ $c=-1.4805269e-05$
 $d=0.017070352$ $e=5.8142682e-10$ $f=-4.6126547e-07$



Rys. 3. Wielomianowa powierzchnia odpowiedzi (stopnia 2) OLD w modelowych produktach mięsnych utrwalonych lizozymem o różnej aktywności przechowywanych w temp. 10°C.

Fig. 3. The polynomial surface of response (the second order) of the total plate count in model meat products preserved using lysozyme showing different activity and stored at 10°C.

Objaśnienia / Explanation:

z - log OLD [jtk/g] / log of the total plate count of bacteria [cfu]/g]; x - czas [dni] / period [days]; y - dodatek lizozymu [U/g] / level of lysozyme added[U/g];

a - stała / constant;

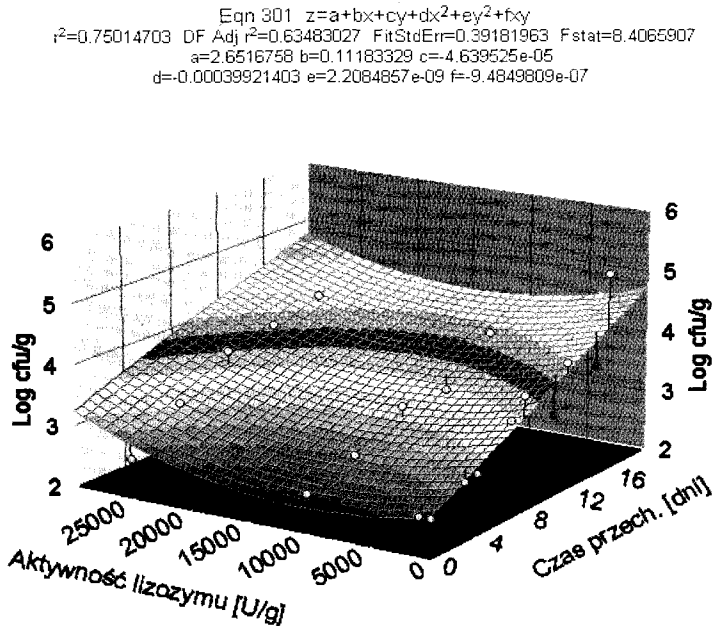
b, c, d, e - parametry funkcji wielomianowej / parameters of a polynomial function;

$r^2=R^2$ - współczynnik determinacji / R square;

adj $r^2=$ adj R^2 - zrewidowany współczynnik determinacji / adjusted R square;

błąd szacunku / standard error of estimation;

wartość statystyki F / F - the value of the statistics.



Rys. 4. Wielomianowa powierzchnia odpowiedzi (stopnia 2) LBPs w modelowych produktach mięsnych utrwalonych lizozymem o różnej aktywności przechowywanych w temp. 10°C.

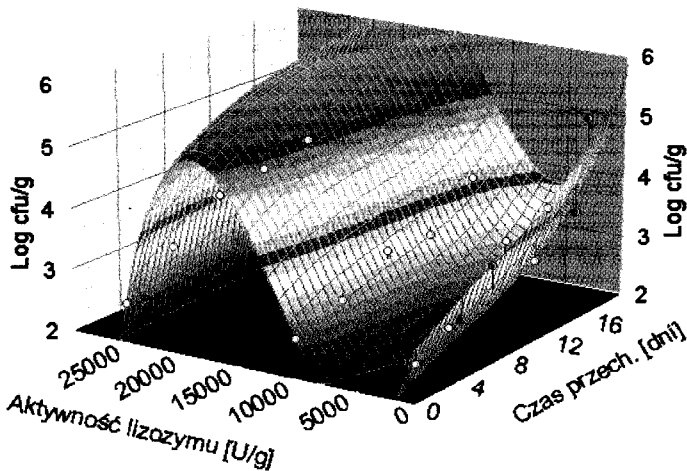
Fig. 4. The polynomial surface of response (the second order) of the total plate count of *Pseudomonas* bacteria in model meat products preserved using lysozyme showing different activity and stored at 10°C.

Objaśnienia / Explanation:

z - log LBPs [jtk/g] / log total plate count of bacteria [cfu/g],

Pozostałe objaśnienia jak na rys. 3. / All other explanatory notes as in Fig. 3.

Eqn 310 $z = a + bx + cy + dx^2 + ey^2 + fxy + gx^3 + hy^3 + ixy^2 + jx^2y$
 $r^2 = 0.88221451$ DF Adj $r^2 = 0.75134175$ FitStdErr = 0.31831261 Fstat = 8.3222336
 $a = 2.8670327$ $b = 0.14039334$ $c = -0.00065307785$ $d = -0.0077214226$ $e = 8.797193e-08$
 $f = -3.2303096e-06$ $g = 0.0004072739$ $h = -2.490691e-12$ $i = 2.6455725e-10$ $j = -2.72485e-07$

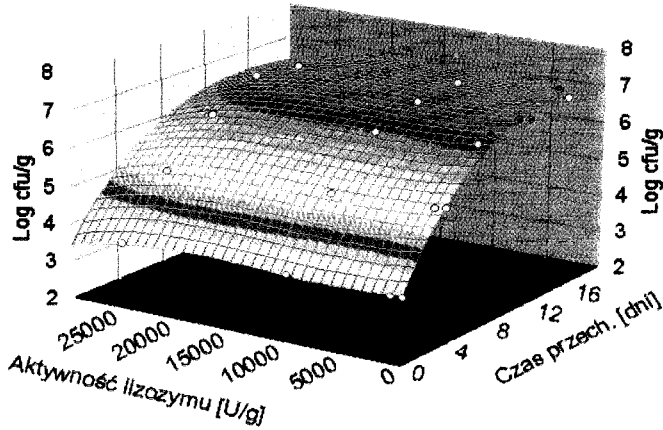


Rys. 5. Wielomianowa powierzchnia odpowiedzi (stopnia 3) LBPs w modelowych produktach mięsnych utrwalonych lizozymem o różnej aktywności przechowywanych w temp. 10°C.

Fig. 5. The polynomial surface of response (the third order) of the total plate count of *Pseudomonas* bacteria in model meat products preserved using lysozyme showing different activity and stored at 10°C.

Objaśnienia jak na rys. 4. / Explanatory notes as in Fig. 4.

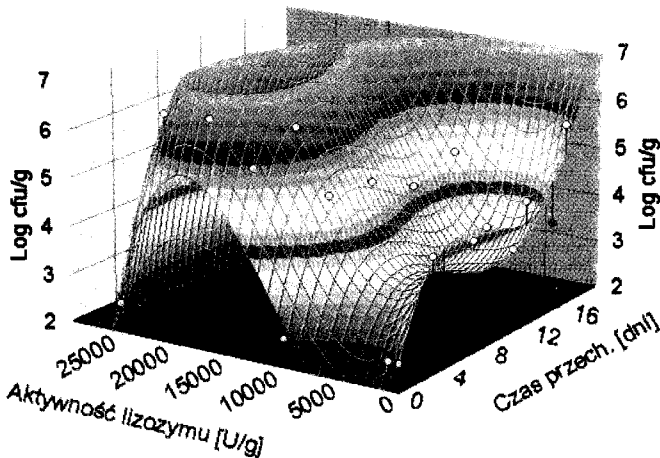
Eqn 310 $z=a+bx+cy+dx^2+ey^2+bx^2+cy^2+gx^3+hy^3+ixy^2+jx^2y$
 $r^2=0.99038208$ DF Adj $r^2=0.97969561$ FitStdErr=0.17165727 Fstat=114.41403
 $a=3.815398$ $b=0.54418424$ $c=-3.8464958e-05$ $d=-0.026332023$ $e=4.2631563e-09$
 $f=-1.8763988e-05$ $g=0.00032933367$ $h=-1.1517663e-13$ $i=-1.2432678e-11$ $j=1.0622117e-07$



Rys. 6. Wielomianowa powierzchnia odpowiedzi (stopnia 3) OLD w modelowych produktach mięsnych utrwalonych lizozymem o różnej aktywności, przechowywanych w temp. 20°C.

Fig. 6. The polynomial surface of response (the third order) of the total plate count in model meat products preserved using lysozyme showing different activity and stored at 20°C.
 objaśnienia jak na rys. 3. / Explanatory notes as in Fig. 3.

Eqn 310 $z=a+bx+cy+dx^2+ey^2+bx^2+cy^2+gx^3+hy^3+ixy^2+jx^2y$
 $r^2=0.83436868$ DF Adj $r^2=0.6503343$ FitStdErr=0.60964718 Fstat=6.5972364
 $a=2.6562578$ $b=0.81937063$ $c=-0.00060808792$ $d=-0.10692295$ $e=8.8105526e-03$
 $f=1.10463865e-05$ $g=0.0041129297$ $h=-2.53794336e-12$ $i=8.1309946e-11$ $j=-9.6417348e-07$



Rys. 7. Wielomianowa powierzchnia odpowiedzi (stopnia 3) LBP's w modelowych produktach mięsnych utrwalonych lizozymem o różnej aktywności, przechowywanych w temp. 20°C.

Fig. 7. The polynomial surface of response (the third order) of the total plate count of *Pseudomonas* bacteria in model meat products preserved with lysozyme showing different activity and stored at 20°C.
 objaśnienia jak na rys. 4. / Explanatory notes as in Fig. 4.

Tabela 7

Ogólna liczba drobnoustrojów [log jtk/g] w produktach mięsnych utrwalonych lizozymem przechowywanych w temp. 20°C (dane ekstrapolowane do 20. dnia przechowywania).

The total plate count [log cfu/g] in model meat products preserved using lysozyme stored at 20°C (the data extrapolated up to the 20th day of storing).

Czas przechowywania [dni] Storing period [days]	Aktywność lizozymu [U/g] Activity of lysozyme [U/g]			
	Kontrolna Control sample	1 000	10 000	25 000
0	3,8154	3,7811	3,7439	3,7311
4	5,5919	5,5518	5,4577	5,3321
8	6,6522	6,6098	6,4899	6,3034
12	7,1229	7,0815	6,9671	6,7717
16	7,1303	7,0935	7,0156	6,8632
20	6,8009	6,7722	6,7621	6,7046

Na rys. 7. przedstawiono model wielomianowy stopnia trzeciego LBP_s w produktach mięsnych, przechowywanych w temp. 20°C, który jest znacznie lepiej dopasowany (83%) niż model wielomianowy stopnia drugiego (55%). Kształt przedstawionego modelu jest jednak trudny do zinterpretowania.

Ekstrapolacja LBP_s [log jtk/g] przeprowadzona z wykorzystaniem modelu wielomianowego stopnia trzeciego (tab. 8) daje znacznie wyższe wartości log jtk/g niż w przypadku modelu wielomianowego stopnia drugiego. Ze względu na fakt, że w obrębie danych eksperymentalnych model wielomianowy stopnia 3. lepiej odwzorowywał liczbę bakterii *Pseudomonas* można sądzić, że dane ekstrapolowane są wiarygodne (tab. 8).

Na podstawie istotności parametrów modeli wielomianowych (stopnia 2. i stopnia 3.) rozwoju ogólnej liczby drobnoustrojów w produktach mięsnych przechowywanych w temp. 10°C można stwierdzić, które z czynników środowiskowych mają wpływ na rozwój badanych grup drobnoustrojów. Dodatek lizozymu nie miał statystycznie istotnego wpływu na rozwój ogólnej liczby drobnoustrojów (tab. 9). Wielomian stopnia trzeciego wskazuje na statystycznie istotny wpływ lizozymu na liczbę bakterii *Pseudomonas* (tab. 9), czego nie wykazuje model wielomianowy stopnia drugiego.

Na ogólną liczbę drobnoustrojów oraz ogólną liczbę bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, obecnych w produktach mięsnych przechowywanych w temp. 20°C, nie wpływał istotnie lizozym, natomiast znaczenie miał czas przechowywania (tab. 10).

Tabela 8

Liczba bakterii *Pseudomonas* [log cfu/g] w modelowych produktach mięsnych utrwalonych lizozymem przechowywanych w temp. 20°C (dane ekstrapolowane do 20. dnia przechowywania).

The total plate count of *Pseudomonas* bacteria [log cfu/g] in model meat products preserved using lysozyme stored at 20°C (the data extrapolated up to the 20th day of storing)

Czas przechowywania [dni] Storing period [days]	Aktywność lizozymu [U/g] Activity of lysozyme [U/g]			
	Kontrolna Control sample	1 000	10 000	25 000
0	2,6563	2,1337	2,8480	2,8646
4	4,4862	3,9928	4,9981	5,6169
8	4,4740	3,9788	4,9974	5,7556
12	4,1989	3,6711	4,4255	4,8602
16	5,2405	4,6492	4,8615	4,5100
20	9,1779	8,4923	7,8850	6,2844

Tabela 9

Wartości parametrów modeli wielomianowych (różnego stopnia) opracowanych dla różnych grup bakterii w modelowych produktach mięsnych przechowywanych w temp. 10°C.

Parameter values of polynomial models (of different orders) developed for various groups of bacteria in model meat products stored at 10°C.

Zmienna Variable	OLD/TPC		LBPs/TPC of <i>Pseudomonas</i>	
	stopień 2 the second order	stopień 3 the third order	stopień 2 the second order	stopień 3 the third order
Stała / Constant	3,78*	3,86*	2,65*	2,86*
Czas / Time	-0,19*	-0,28*	0,11*	0,14
Lizozym / Lysozyme	0,00	0,00	-0,00	-0,00*
Czas ² / Time ²	-0,01*	0,03*	-0,00	-0,00
Lizozym ² / Lysozyme ²	0,00	-0,00	0,00	0,00*
Czas·lizozym / Time·lysozyme	0,00	-0,00	0,00	0,00
Czas ³ / Time ³		0,00		0,00
Lizozym ³ / Lysozyme ³		0,00		0,00*
Czas·lizozym ² /Time·lysozyme ²		0,00		0,00
Czas ² ·lizozym/Time ² ·lysozyme		0,00		0,00
R ²	0,936	0,957	0,750	0,882

0,01 < p < 0,05;

Tabela 10

Wartości parametrów modeli wielomianowych (różnego stopnia) opracowanych dla różnych grup bakterii w modelowych produktach mięsnych przechowywanych w temp. 20°C.

Parameter values of polynomial models (of different orders) developed for various groups of bacteria in model meat products stored at 20°C.

Zmienna Variable	OLD / TPC		LBPs / TPC of <i>Pseudomonas</i>	
	stopień 2 the second order	stopień 3 the third order	stopień 2 the second order	stopień 3 the third order
Stała / Constant	3,85*	3,81*	2,45*	2,65*
Czas / Time	0,48*	0,54*	0,38*	0,81*
Lizozym / Lysozyme	-0,00	-0,00	0,00	-0,00
Czas ² / Time ²	-0,01*	-0,02*	-0,01*	-0,01*
Lizozym ² / Lysozyme ²	0,00	0,00	0,00	0,00
Czas·lizozym / Time·lysozyme	0,00	0,00	0,00	0,00
Czas ³ / Time ³		0,00		0,004*
Lizozym ³ / Lysozyme		0,00		0,00
Czas·lizozym ² /Time·lysozyme		0,00		0,00*
Czas ² ·lizozym/Time ² ·lysozyme		0,00		0,00
R ²	0,988	0,990	0,558	0,834

0,01 < p < 0,05;

Wnioski

1. Hamujący efekt działania lizozymu na rozwój bakterii *Pseudomonas* zależy od jego aktywności (najskuteczniejsza 1000U/g) i temperatury przechowywania produktu (w temperaturze 10°C efekt inaktywacji bakterii zachodził najszybciej).
2. Wyniki uzyskanych badań pozwoliły na konstruowanie modeli Gomperta i logistycznych dobrze opisujących rozwój grup drobnoustrojów (bakterii tlenowych i bakterii *Pseudomonas*) w produktach z mięsa rozdrobnionego, w czasie przechowywania, w poszczególnych zakresach temperatury.
3. Wielomiany drugiego stopnia były 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, 7 (3), 121-128.

- [2] Buchanan R.L.: Developing and distributing user-friendly application software. *J. Ind. Microbiol.*, 1993, **12** (3-5), 251-255.
- [3] 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, **61** (7), 839-844.
- [4] Goryl A., Jędrzejczyk Z., Kukuła K., Osiewalski J., Walkosz A.: Wprowadzenie do ekonometrii w przykładach i zadaniach, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 1996.
- [5] Ibrahim H.R., Kato A., Kobayashi K.: Antimicrobial effects of lysozyme against gram-negative bacteria due to covalent binding of palmitic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 1991, **39** (11), 2077-2082.
- [6] Ibrahim H.R., Hatta H., Fujiki M., Kim M., Yamamoto T.: Enhanced antimicrobial action of lysozyme against gram-negative and gram-positive bacteria due to modification with perillaldehyde. *J. Agric. Food Chem.*, 1994, **42** (8), 1813-1817.
- [7] Ibrahim H.R., Higashiguchi S., Juneja L.R., Kim M., Yamamoto T.: A structural phase of heat-denaturated lysozyme with novel antimicrobial action. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44** (6), 1416-1423.
- [8] Kijowski J., Leśniewski G.: Lizozy z białka jaja naturalnym konserwantem żywności, Materiały XXXI Sesji Naukowej KTiChŻ PAN, Poznań, 2000, s. 47-56.
- [9] Kijowski J., Marciszewska C., Cegielski-Radziejewska R.: Quality and microbiological stability of chilled breast muscles treated with a lysozyme solution. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **11/52**, 2002, 47.
- [10] Kołożyn – Krajewska D., Sikora T.: HACCP. Koncepcja i system zapewniania bezpieczeństwa zdrowotnego żywności, SITSpoz, Warszawa 1999.
- [11] Leśniewski G., Kijowski J.: Aktywność enzymatyczna lizozymu i jej wykorzystanie do utrwalania żywności. *Przem. Spoż.*, 1995, **4**, 116.
- [12] Leśniewski G., Cegielska-Radziejewska R., Kijowski J.: Antibacterial activity of thermally modified lysozyme. *EJPAU*, 2001, **4**, 1.
- [13] Leśniewski G., Kijowski J., Stangierski J., DSC, SDS-Page and spectrophotometry for characterization of modified lysozyme, *EJPAU*, **6**, 2003, 1.
- [14] 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, **67**, 339.
- [15] McMeekin T.A., Olley J.N., Ross T., Ratkowsky D.A.: Predictive microbiology, theory and application, RST LTD., England 1993.
- [16] Nakamura S., Koto A., Kobayashi K.: New antimicrobial characteristics of lysozyme-dextran conjugate. *J. Agric. Food Chem.*, 1991, **39**, 674.
- [17] Nakamura S., Koto A., Kobayashi K.: Bifunctional lysozyme-galactomannan conjugate having excellent emulsifying properties and bactericidal effect. *J. Agric. Food Chem.*, 1992, **40**, 735.
- [18] Payne K.D., Oliver S.P., Davidson P.M.: Comparison of EDTA and apo-lactoferrin with lysozyme on the growth of food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *J. Food Prot.*, 1994, **57**, 62.
- [19] PN-A-82055-6:1994. Mięso i przetwory mięsne. Badania mikrobiologiczne, oznaczanie ogólnej liczby drobnoustrojów.
- [20] PN-ISO 13720: 1999. Mięso i przetwory mięsne. Oznaczanie liczby bakterii z rodzaju *Pseudomonas*.
- [21] Ross T., McMeekin T.A.: Predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol.*, 1994, **23**, 241.
- [22] Van Gerwen S., Zwietering M.H.: Growth and inactivation models to be used in quantitative risk assessments. *J. Food Prot.*, 1998, **61**, 1541.
- [23] Whiting R.C., Buchanan R.L.: Microbial modeling. *Food Technol.*, 1994, **48**, 113.

**THE APPLICATION OF PROGNOSTIC MICROBIOLOGY METHODS IN MODELING
THE GROWTH OF SAPROPHYTIC BACTERIA IN MEAT PRODUCTS PRESERVED
USING LYSOZYME IN THE FORM OF A DIMER**

S u m m a r y

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

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