

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΕ ΜΕΤΑΒΑΛΛΟΜΕΝΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ**Μ. Γιαννακούρου¹, Ν. Στοφόρος^{2,*}**¹Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής²Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
(*stoforos@aua.gr)**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Για τη διασφάλιση της βέλτιστης διατηρησιμότητας των τροφίμων, αναπτύσσονται μαθηματικά μοντέλα τα οποία μπορούν να προβλέψουν τη μικροβιακή ανάπτυξη κάτω από ποικίλες, τόσο ισοθερμοκρασιακές όσο και δυναμικές, μη ισοθερμοκρασιακές, συνθήκες. Αρχικά, χρησιμοποιώντας δεδομένο δυναμικό θερμοκρασιακό προφίλ και δημοσιευμένα πειραματικά δεδομένα, έγινε συγκριτική εφαρμογή τυπικών "δυναμικών" μοντέλων μικροβιακής ανάπτυξης. Ως παράδειγμα πρακτικής εφαρμογής, χρησιμοποιήθηκε το δυναμικό πρωτογενές μοντέλο του Gompertz σε συνδυασμό με ένα δευτερογενές μοντέλο τύπου τετραγωνικής ρίζας προκειμένου να περιγραφεί η επίδραση της διαφορετικής θέσης στο εσωτερικό ενός τροφίμου στην μικροβιακή ανάπτυξη κατά την αποθήκευσή του υπό ψύξη.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα μαθηματικά μοντέλα μικροβιακής ανάπτυξης έχουν ως στόχο να προβλέψουν τη μικροβιακή ανάπτυξη τόσο σε ισοθερμοκρασιακές όσο και σε δυναμικές, μη ισοθερμοκρασιακές συνθήκες. Η προρρητική μικροβιολογία μελετά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και χρησιμοποιεί θεμελιωμένες και τεκμηριωμένες μαθηματικές εξισώσεις που αποτυπώνουν με αξιοπιστία τα πειραματικά δεδομένα, με σκοπό να προβλέψει την ανάπτυξη του εκάστοτε μικροοργανισμού σε συνθήκες διαφορετικές από αυτές στις οποίες πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα. Η μεθοδολογία που ακολουθείται ξεκινά από τον πειραματικό σχεδιασμό και τη συλλογή αξιόπιστων πειραματικών δεδομένων σε συνθήκες που επιλέγονται προσεκτικά, ακολουθεί η περιγραφή της μικροβιακής ανάπτυξης με προσαρμογή των ισοθερμοκρασιακών δεδομένων στο κατάλληλο πρωτογενές μοντέλο, και στη συνέχεια η περιγραφή της επίδρασης διαφόρων εξωγενών παραγόντων, με κυρίαρχη τη θερμοκρασία, με τη βοήθεια του κατάλληλου δευτερογενούς μοντέλου (two-steps approach). Στην πρόσφατη βιβλιογραφία, υπάρχουν εργασίες που μελετούν τη μικροβιακή ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών σε πλήθος τροφίμων με χρήση διαφόρων κινητικών προσεγγίσεων και εξισώσεων ^[1-4], ενώ σε κάποιες από αυτές η μελέτη επεκτείνεται με επαλήθευση (validation) των μαθηματικών αυτών προτύπων σε δυναμικές θερμοκρασιακές συνθήκες ^[1]. Στην περίπτωση αυτή, προτείνεται η χρήση διαφορικών εξισώσεων και αριθμητική λύση, εφόσον δεν είναι συνήθως εφικτή η αναλυτική λύση του προβλήματος. Στο σημείο αυτό, προσοχή πρέπει να δίνεται στη χρήση των κινητικών παραμέτρων που έχουν υπολογισθεί μέσω ισοθερμοκρασιακών πειραμάτων για την εκτίμηση της μικροβιακής ανάπτυξης υπό μη σταθερές συνθήκες ^[2].

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να παρουσιάσει την εφαρμογή επιλεγμένων μαθηματικών εξισώσεων σε πειραματικά δεδομένα της βιβλιογραφίας, ώστε να ελεγχθεί το κατά πόσο μπορούν αξιόπιστα να περιγράψουν τα εκάστοτε πειραματικά δεδομένα μικροβιακής ανάπτυξης. Η μελέτη περιλαμβάνει επίσης και μια πρακτική εφαρμογή ενός τέτοιου μαθηματικού προτύπου προκειμένου να προβλεφθεί η μικροβιακή ανάπτυξη σε ένα τρόφιμο υπό ψύξη, σε διαφορετικά σημεία του εσωτερικού του.

ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Πλήθος μαθηματικών εξισώσεων παρατίθενται στη βιβλιογραφία για την περιγραφή της μικροβιακής ανάπτυξης σε σταθερή θερμοκρασία (πρωτογενή μοντέλα), με τα ευρύτερα

χρησιμοποιούμενα να είναι αυτά των Gompertz, Baranyi, Richards, logistic, και το γραμμικό μοντέλο τριών φάσεων [5]. Αναφορικά με τα δευτερογενή μοντέλα, δύο είναι οι βασικότερες κατηγορίες εξισώσεων για τη μαθηματική περιγραφή της επίδρασης της θερμοκρασίας στη μικροβιακή ανάπτυξη. Πρόκειται για τις εξισώσεις που στηρίζονται στη θεμελιώδη σχέση του Arrhenius καθώς και εκείνες που απορρέουν από τη θεωρία του Bělehrádek (γνωστές και ως εξισώσεις τετραγωνικής ρίζας) [6].

Για τη διαμόρφωση των δυναμικών μοντέλων χρησιμοποιούνται συνήθως δυο διαφορετικά μοντέλα, ένα πρωτογενές και ένα δευτερογενές, τα οποία συνδέονται σε μια εξίσωση. Από τις διάφορες εξισώσεις που έχουν προταθεί, εκείνες που παρατίθενται σε μορφή διαφορικής εξίσωσης αποδεικνύονται πιο κατάλληλες να περιγράψουν τη μικροβιακή ανάπτυξη. Παραδείγματα εξισώσεων που χρησιμοποιούνται είναι οι ακόλουθες:

(1) Πρωτογενές μοντέλο Baranyi [7]:

Η μορφή της εξίσωσης Baranyi για σταθερές θερμοκρασιακές συνθήκες δίνεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\ln(N(t)) = \ln(N_o) + \mu_{\max} \cdot A(t) - \ln \left[1 + \frac{\exp(\mu_{\max} \cdot A(t)) - 1}{\exp(\ln(N_{\max}) - \ln(N_o))} \right] \quad (1)$$

όπου

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \cdot \ln[\exp(-\mu_{\max} \cdot t) + \exp(-\mu_{\max} \cdot \lambda) - \exp(-\mu_{\max} \cdot (t + \lambda))] \quad (2)$$

όπου $N(t)$ ο πληθυσμός των μικροοργανισμών τη χρονική στιγμή t , CFU/mL, N_o ο πληθυσμός των μικροοργανισμών στο χρόνο μηδέν, CFU/mL, μ_{\max} ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, $\log(\text{CFU/mL})/\text{h}$, και λ η χρονική διάρκεια της φάσης υστέρησης, h.

Το μοντέλο αυτό απαιτεί τον προσδιορισμό τεσσάρων παραμέτρων (N_o , N_{\max} , μ_{\max} , λ) προκειμένου να περιγράψει την ανάπτυξη του επιλεγμένου μικροοργανισμού. Αντικαθιστώντας το N_o με το $N(t-\Delta t)$, δηλαδή τον πληθυσμό μικροοργανισμών στο εκάστοτε προηγούμενο χρονικό διάστημα, η προκύπτουσα εξίσωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί, σε συνδυασμό με κατάλληλο δευτερογενές μοντέλο, για την πρόβλεψη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε δυναμικές θερμοκρασιακές συνθήκες.

(2) Πρωτογενές μοντέλο Huang [8]:

Το μοντέλο αυτό περιγράφεται από την ακόλουθη διαφορική εξίσωση:

$$\frac{dN}{dt} = \frac{\mu_{\max} \left(1 - \frac{N}{N_{\max}} \right)}{1 + e^{[-a(t-\lambda)]}} \quad (3)$$

όπου μ_{\max} , λ και N_{\max} είναι ο μέγιστος ειδικός ρυθμός μικροβιακής ανάπτυξης, η λανθάνουσα φάση και ο μέγιστος αριθμός κυττάρων, αντίστοιχα και a ένας εμπειρικός συντελεστής.

Η παραπάνω εξίσωση μπορεί να μετασχηματιστεί στην αντίστοιχη ολοκληρωτική μορφή του πρωτογενούς μοντέλου για ισοθερμοκρασιακές συνθήκες:

$$\ln N = \ln N_o + \ln N_{\max} - \ln \left(e^{(\ln N_o)} + \left[e^{\ln N_{\max}} - e^{\ln N_o} \right] \cdot e^{(-\mu_{\max} B)} \right) \quad (4)$$

όπου N_0 είναι το αρχικό μικροβιακό φορτίο και το B υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$B = t + \left(\frac{1}{\alpha'}\right) \cdot \ln\left(\frac{1 + e^{-\alpha'(t-\lambda)}}{1 + e^{\alpha'\lambda}}\right) \quad (5)$$

Το μοντέλο αυτό απαιτεί τον προσδιορισμό πέντε παραμέτρων (N_0 , N_{max} , μ_{max} , λ , α') προκειμένου να περιγράψει την ανάπτυξη του επιλεγμένου μικροοργανισμού.

(3) Δυναμικό πρωτογενές μοντέλο Gompertz:

Το μοντέλο του Gompertz

$$L(t) = A + (B - A)e^{\left(-e^{[-\mu_{max}(t-M)]}\right)} \quad (6)$$

όπου $L(t)$ είναι το $\log_{10}(\text{CFU/mL})$ της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών, A και B είναι ο αρχικός και τελικός πληθυσμός, t ο χρόνος ανάπτυξης, μ_{max} ο σχετικός ρυθμός ανάπτυξης στο χρονικό σημείο M και M ο χρόνος κατά τον οποίο ο απόλυτος ρυθμός ανάπτυξης λαμβάνει τη μέγιστη τιμή του,

μετασχηματίστηκε στη διαφορική του μορφή [2],

$$\frac{dL}{dt} = \mu_{max} (B - A)e^{\left(-e^{[-\mu_{max}(t-M)]}\right)} \cdot e^{[-\mu_{max}(t-M)]} \quad (7)$$

που μπορεί επιπλέον να απλοποιηθεί ως ακολούθως [2]:

$$\frac{dL}{dt} = \mu_{max} (L - A) \ln\left(\frac{B - A}{L - A}\right) \quad (8)$$

Εφόσον σε δυναμικές συνθήκες τόσο η παράμετρος μ όσο και το M είναι συναρτήσεις της θερμοκρασίας, οι διαφορικές εξισώσεις (9 και 10) δεν επιδέχονται αναλυτική λύση, οπότε είναι αναγκαία η χρήση επαναληπτικού αλγορίθμου για αριθμητική επίλυση του προβλήματος. Για το λόγο αυτό, απαιτείται η εκτίμηση μιας αρχικής τιμής της παραμέτρου L . Επειδή όμως για $t=0$, $L=A$ και δημιουργείται πρόβλημα στην εξίσωση (8), χρησιμοποιείται μια διαφορετική, ψευδο-αρχική τιμή (σύμφωνα με τη μεθοδολογία που προτείνεται από τους Van Impe et al. [9]), επιλέγοντας ένα πολύ μικρό ΔL_0 σε χρόνο $t=0$ και χρησιμοποιώντας την ακόλουθη σχέση:

$$L_0 = A + \Delta L_0 \quad (9)$$

Στη συνέχεια, βηματικά επιλύεται η εξίσωση (8).

Το μοντέλο αυτό απαιτεί τον προσδιορισμό τριών παραμέτρων (μ_{max} , A , B) προκειμένου να περιγράψει την ανάπτυξη του επιλεγμένου μικροοργανισμού.

Αναφορικά με τα δευτερογενή μοντέλα που περιγράφουν την επίδραση της θερμοκρασίας στις παραμέτρους του πρωτογενούς μοντέλου, στο μοντέλο του Baranyi εφαρμόζονται οι ακόλουθες εξισώσεις του γνωστού μοντέλου τετραγωνικής ρίζας (square root model):

$$\sqrt{\mu_{max}} = a(T - T_{min}) \quad (10)$$

$$\sqrt{1/\lambda} = a(T - T_{\min}) \quad (11)$$

ενώ ο Huang ^[2] χρησιμοποίησε διαφοροποιημένες μορφές της παραπάνω εξίσωσης που έχει ως βάση το γενικό μοντέλο της τετραγωνικής ρίζας, για την επίδραση της θερμοκρασίας στην παράμετρο του μ_{max} :

$$\mu_{max} = a(T - T_{\min})^{1.5} \quad (12)$$

ή εναλλακτικά (σε συνδυασμό με την εξίσωση Gompertz):

$$\mu_{max} = a(T - T_{\min})^2 \cdot (1 - e^{(b(T - T_{max}))}) \quad (13)$$

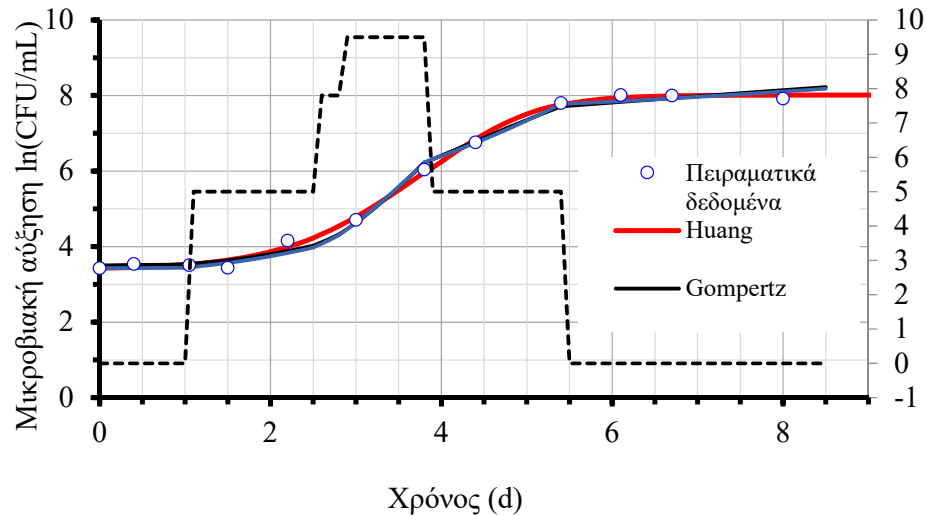
Στην παρούσα μελέτη, ως παράδειγμα για τον προσδιορισμό των παραμέτρων με βάση πειράματα σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες, αντλήθηκαν δεδομένα και μεθοδολογία από τη βιβλιογραφία ^[10,11], και επιλέχθηκαν οι παραπάνω συνδυασμοί πρωτογενών-δευτερογενών εξισώσεων (Εξ. 1 και 2 με Εξ. 10, Εξ. 3 έως 5 με Εξ. 11 και Εξ. 8 με Εξ. 13). Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει την αναπαραγωγή των δημοσιευμένων θερμοκρασιακών προφίλ και των πειραματικών σημείων μικροβιακής αύξησης, την κατασκευή μιας ενιαίας εξίσωσης που περιλαμβάνει το πρωτογενές και το δευτερογενές μοντέλο, και τον ταυτόχρονο προσδιορισμό όλων των παραμέτρων σε ένα βήμα, με χρήση του εργαλείου SOLVER του EXCEL. Με βάση τις παραπάνω εναλλακτικές εξισώσεις, και πειραματικά δεδομένα που αφορούν σε ανάπτυξη ψευδομονάδων σε τσιπούρα ^[11], ελήφθησαν οι καμπύλες του Σχήματος 1.

Για το μοντέλο του Baranyi με ενσωματωμένο το δευτερογενές μοντέλο (5 μεταβλητές), οι παράμετροι που υπολογίστηκαν ήταν: $\log(N_0)=3.43$ [N in CFU/mL], $\log(N_{max})=4.412$ [N in CFU/mL], $T_{min}=-2.268$ [°C], και $\alpha=0.03160$, με $R^2=0.9948$ και $RMSE=0.1392$.

Για την εξίσωση του Huang ^[8] με 6 μεταβλητές (N_0 , N_{max} , T_{min} , λ , α' και α), ($R^2=0.9975$ και $RMSE=0.0920$), οι παράμετροι που υπολογίστηκαν ήταν: $N_0=30.81$ [CFU/mL], $N_{max}=3007$ [CFU/mL], $T_{min}=-514.4$ [K], $\lambda=2.706$ [d], $\alpha'=1.43$ και $\alpha=0.003228$.

Για την εξίσωση του Gompertz (στη διαφορική του μορφή ^[2]) με 6 μεταβλητές (A , B , T_{min} , T_{max} , a και b), οι παράμετροι που υπολογίστηκαν ήταν: $A=3.4$ [CFU/mL], $B=11.47$ [CFU/mL], $T_{min}=-3.967$ [°C], $T_{max}=-30.000$ [°C], $\alpha=0.004028$, και $b=1.0000$, με $R^2=0.9942$ και $RMSE=0.2062$.

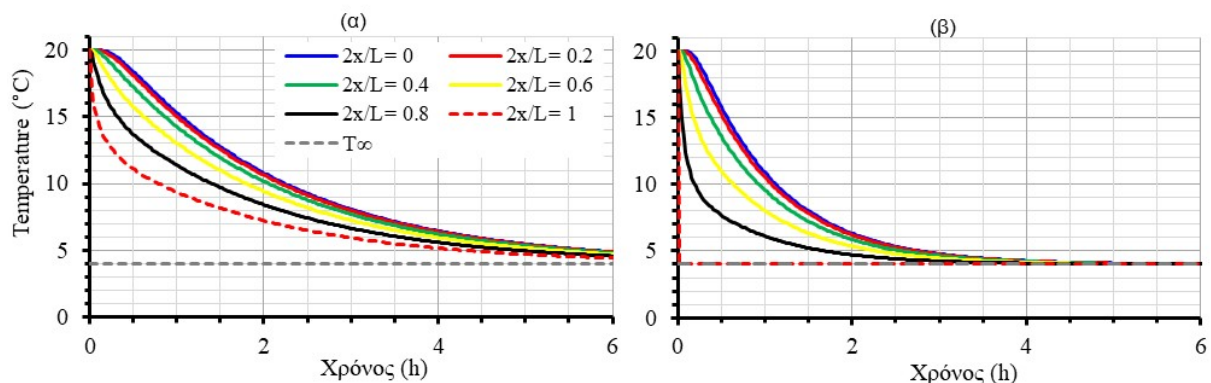
Από την παραπάνω συγκριτική εφαρμογή των μοντέλων στο συγκεκριμένο θερμοκρασιακό προφίλ, προκύπτει ότι όλα τα μοντέλα που εξετάστηκαν περιέγραψαν με ικανοποιητική ακρίβεια τα συγκεκριμένα πειραματικά δεδομένα. Παρόλα αυτά, δεν είναι εφικτό να συναχθούν γενικά συμπεράσματα με τη χρήση ενός και μόνο δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ. Να σημειωθεί ότι για το συγκεκριμένο θερμοκρασιακό προφίλ που χρησιμοποιήθηκε, τα πειραματικά δεδομένα μικροβιακής ανάπτυξης ακολουθούν μια τυπική σιγμοειδή καμπύλη και η χρήση δευτερογενών μοντέλων είναι πρακτικά περιττή. Δηλαδή, τα μοντέλα που εξετάστηκαν κάνουν χρήση περισσότερων παραμέτρων από ότι απαιτείται σε σχέση με τα συγκεκριμένα πειραματικά δεδομένα. Γι' αυτό και το πρωτογενές μοντέλο Huang ^[8] ενώ δεν δυναμικό, περιγράφει ικανοποιητικά τα δεδομένα. Για την πληρέστερη και ορθότερη αξιολόγηση των εναλλακτικών μοντέλων, είναι σκόπιμο να γίνει η εφαρμογή τόσο σε διαφορετικά προφίλ, όσο και σε άλλα σετ πειραματικών δεδομένων μικροβιακής ανάπτυξης με αντίστοιχες καμπύλες με διαφοροποιημένα χαρακτηριστικά (π.χ. ύπαρξη λανθάνουσας φάσης, διαφορετικοί αρχικοί/τελικοί μικροβιακοί πληθυσμοί, κλπ).



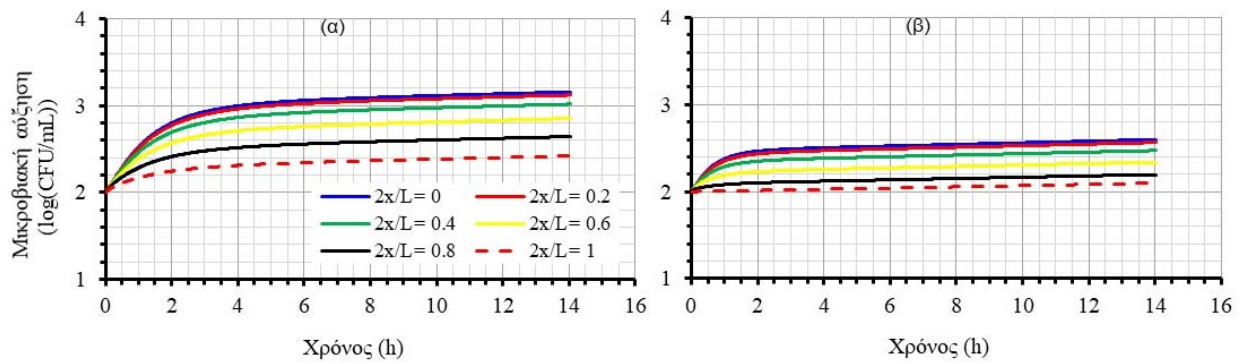
Σχήμα 1. Συγκεντρωτικό σχήμα προσομοίωσης των πειραματικών δεδομένων για μαθηματικά μοντέλα μικροβιακής ανάπτυξης υπό δυναμικές συνθήκες. Ο μικροοργανισμός υπό διερεύνηση είναι οι ψευδομονάδες σε τοιπούρα ^[11].

Το δυναμικό μοντέλο Gompertz ^[2] (Εξ. 8 και 13) χρησιμοποιήθηκε για να προβλέψει τη μικροβιακή ανάπτυξη σε ένα σύστημα τροφίμου με παραμέτρους που προσομοιάζουν τη συμπεριφορά βόειου κίμα, σε περιβάλλον ψύξης. Στα Σχήματα 2α και β απεικονίζεται η μεταβολή της θερμοκρασίας στο εσωτερικό του τροφίμου, σε διαφορετικές αποστάσεις από το κέντρο του (με το x να συμβολίζει την απόσταση από το κέντρο πλάκας μήκους $L=3\text{cm}$, 0: γεωμετρικό κέντρο, 1: επιφάνεια) για δύο διαφορετικούς αριθμούς Bi . Οι καμπύλες που απεικονίζουν την πρόβλεψη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών απεικονίζονται στα Σχήματα 3α και β, ενώ στο Σχήμα 4 αποτυπώνεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε δυο σταθερές θερμοκρασίες (ακραίες όσον αφορά στα θερμοκρασιακά προφίλ που εξετάστηκαν) για τις συγκεκριμένες τιμές των παραμέτρων, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ρεαλιστική πρόβλεψη του μοντέλου. Ο στόχος της συγκεκριμένης μελέτης είναι, με τη χρήση ενός αξιόπιστου "δυναμικού" μοντέλου να εξεταστεί η επίδραση της διαφορετικής θέσης μέσα στο τρόφιμο στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Από τα αποτελέσματα της προσομοίωσης παρατηρείται ότι για σχετικά χαμηλούς ρυθμούς μεταφοράς θερμότητας, $Bi=2$, η διαφορά του μικροβιακού πληθυσμού μεταξύ κέντρου και επιφάνειας του προϊόντος μπορεί να ξεπεράσει τον ένα λογάριθμο.



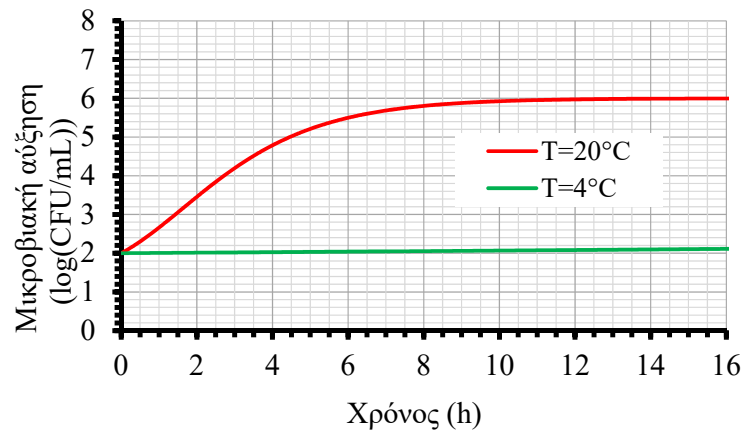
Σχήμα 2. Κατανομή θερμοκρασιών για (α) $Bi = 2$ και (β) $Bi = \infty$ ($T_{\text{IT}}=20^\circ\text{C}$, $T_{\infty}=4^\circ\text{C}$, $L=7\text{ cm}$ και $a=2 \times 10^{-7}\text{ m}^2/\text{s}$).



Σχήμα 3. Επίδραση της θέσης στο προϊόν στην ανάπτυξη μικροοργανισμών για (α) $Bi = 2$ και (β) $Bi = \infty$.

ΤΙΜΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ (Εξίσωση Gompertz)

A	1.5 CFU/mL
B	6 CFU/mL
α	0.0015
T_{min}	2 °C
b	1
T_{max}	30 °C
Δt	0.022685
$\log(N_0)$	2.00



Σχήμα 4. Ανάπτυξη μικροοργανισμών σε δυο σταθερές θερμοκρασίες, 4 και 20°C.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Για την αξιολόγηση των μοντέλων που χρησιμοποιούνται για την περιγραφή δεδομένων μικροβιακής ανάπτυξης υπό δυναμικές θερμοκρασιακές συνθήκες, απαιτείται εξαιρετική προσοχή στη μορφή του θερμοκρασιακού προφίλ που θα χρησιμοποιηθεί. Στη παρούσα μελέτη αναδείχτηκε η πρακτική αξία των προρρητικών αυτών εξισώσεων, με το να περιγραφεί η σημασία της θέσης μέτρησης της θερμοκρασίας σε ένα τρόφιμο, προκειμένου να ληφθούν ρεαλιστικά δεδομένα μικροβιακής ανάπτυξης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Mansur AR, Oh DH. (2016). J. Food Sci., 81(8): M2021-M2030.
- [2] Huang L. (2003). Int. J. Food Microbiol., 87: 217-227.
- [3] Huang L. (2016). J. Food Sci., 81(7): M1754-M1765.
- [4] Longhi DA, Martins WF, da Silva NB, Carciofi BAM, de Aragão GMF, Laurindo JB. (2017). Int. J. Food Microbiol., 240: 57-62.
- [5] Pla ML. (2015). Biomed Res Int., Article ID 365025.
- [6] Li H, Guozhong X, Edmondson A. (2008). J. Food Prod. Market., 14(2): 57-74.
- [7] Baranyi J, Roberts TA. (1994). Int. J. Food Microbiol., 23: 277-94.
- [8] Huang L. (2011). Food Microbiol. 28: 770-776.
- [9] Van Impe JF, Nicolai, BM, Martens T, de Baerdemaeker J, Vandewalle J. (1992). Appl. Environ. Microbiol., 58(9): 2901-2909.
- [10] Lee DS. (2014). Math. Probl. Eng., Article ID 392054.
- [11] Koutsoumanis K. (2001) Appl. Environ. Microbiol., 67(4): 1821-1829.