

# FoodMathModel: Matematisk modelleringsværktøj til optimering af processtyring og produktudvikling indenfor mejeriindustrien





DATO: D. 6. nov. 2012

## Slutrapport

### for projekter med tilskud fra Innovationsloven

#### 1. Projekttitle

FoodMathModel: Matematisk modelleringsværktøj til optimering af processtyring og produktudvikling indenfor mejeriindustrien.

#### 2. NaturErhvervstyrelsens j.nr.

J.nr.; 3414-08-02192

#### 3. Ansøger (titel, navn, adresse, tlf., fax. og e-mail):

Mejeribrugets ForskningsFond, Mejeriforeningen,  
Frederiks Alle 22, 8000 Århus C., 8731 2062.

#### 4. Deltagende samarbejdsparter (navn, adresse, tlf. og e-mail):

DHI

Agern Allé 5, 2970 Hørsholm  
Tlf +45 45159200

Københavns Universitet

Det Biovidenskabelige Fakultet for Fødevarer, Veterinærmedicin og Naturressourcer,  
Københavns Universitet, LIFE, KU  
Institut for Sygdomsbiologi  
Stigbøjlen 4, 1870 Frederiksberg C  
Tlf.: +45 3533 2773 Fax: +45 3533 2755

Arla Foods Innovation Centre Brabrand  
Rørdrumvej 3, Brabrand  
Tlf. 8746 6710

#### 5. Kontaktpersoner (titel, navn, adresse, tlf. og e-mail, for hver deltagende institution/virksomhed er der er udpeget én kontaktperson)

Ann Detmer, DVM PhD (projektleder)  
DHI  
Agern Allé 5, 2970 Hørsholm

Tlf +45 45159200 ad@dhigroup.com

Hanne Ingmer, Professor

Institut for Sygdomsbiologi, Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet

Stigbøjlen 4, 1870 Frederiksberg C

Tlf.: +45 3533 2773 Fax: +45 3533 2755; hi@sund.ku.dk

Søren K. Lillevang, Arla Foods Innovation Centre Brabrand

soren.k.lillevang@arlafoods.com, direkte tlf. +45 8746 6710, mobile: +45 4050 3922

#### **6. Øvrige projektmedarbejdere (titel, navn, adresse, tlf. og e-mail)**

Marianne Halberg Larsen, Lektor, Institut for Sygdomsbiologi mhl@sund.ku.dk, Tlf.: +45 3533

2719 Fax: +45 3533 2750

#### **7. Projektets start- og slutdato**

1 Marts 2009 - 29 Februar 2012

## 8. Slutrapport

### A. Sammendrag af projektets formål og indhold i henhold til den godkendte projektansøgning:

Formålet var at udvikle et matematisk modelleringsværktøj inden for området fødevarer sikkerhed. Modellen skulle kunne reducere tidskrævende og kostbare forsøg fx i forbindelse med proces- og produktudvikling og desuden kunne bruges til vurdering af færdige produkters holdbarhed i en fleksibel og effektiv implementering af den nye EU-lovgivning (EF 2073/2005). Specifikt skulle der fokuseres på den patogene bakterie *Listeria monocytogenes* (LM) i ost.

### B. Projektets resultater og konklusion

I dette projekt er det lykkedes at udvikle et matematisk modelleringsværktøj, der kan forudsige vækst af LM i en blå hvid skimmelost ud fra ostens produktkarakteristik. Modellen er baseret på sekundære modeller udviklet for data fra bouillon-forsøg. De sekundære modeller beskriver indflydelsen af NaCl, temperatur, pH og mælkesyre på væksten af LM. Modellen er efterfølgende blevet kalibreret og valideret for data baseret på vækstforsøg i en specifik blød blå/hvid ost. Model resultaterne viste at LM kan forøges 3-3½ log i den undersøgte osts holdbarhedsperiode og der var god korrelation mellem målte og simulerede resultater. Det kan dermed konkluderes at det er vigtigt at undgå kontaminering af den undersøgte ost med LM. Ost udgør et kompliceret og dynamisk miljø, som varierer i tid og rum, både kemisk og fysisk, og hvor LM potentielt kan vokse i mange tilfælde. Det meget dynamiske vækstmiljø i blød blå/hvid ost har været en faglig udfordring i projektet, men det er blevet målt og indføjet i modellen, hvilket viste sig at være en nødvendighed for at opnå tilfredsstillende nøjagtighed i modelresultaterne. Specielt har det vist sig at pH dynamikken har en meget styrende rolle for væksten af LM i ost.

### C. Projektets faglige forløb

Projektet var fra starten planlagt til at indeholde 4 faser, a-d (se nedenfor). Indholdet blev tilpasset resultater undervejs på en måde der er beskrevet i afsnit "J. Uddybende beskrivelse af projektets forløb og opnåede resultater".

- a) Produktkarakterisering og produktion af vækst/drabskurver. Vi har målt både vækstkurver både i bouillon, og i blå hvid ost. Derudover har vi ud fra målinger bestemt produktkarakteristikken for blå hvid ost med særlig vægt på udviklingen over tid af vækstmiljøet.
- b) Udvikling og kalibrering af model for prædiktion af LM. Det er lykkedes at udvikle en deterministisk model for vækst af LM i ost, hvilket hidtil har været et område som eksisterende generiske modeller har haft svært ved at simulere nøjagtigt. Modellen har tydeliggjort hvad mange af de eksisterende generiske modelværktøjer mangler for at kunne simulere vækst af LM i ost: vækstmiljøet i ost er meget dynamisk og det er nødvendigt at et modelværktøj kan håndtere denne dynamik for at kunne simulere vækst af LM i ost.
- c) Udvikling og verifikation af stokastisk modelværktøj til at vurdere risikoen for udvikling af LM. Ideen om en udvikling af en stokastisk model blev droppet, da udvikling af en sådan model viste sig at være mere ressourcekrævende med hensyn til etablering af datagrundlag end først antaget. I fase B af projektet viste det sig at forskellige testede LM stammer opførte sig ret forskelligt og dermed med store variationer i model parametre. En stokastisk model

hvor alle de indgående model parametre er beskrevet som en realistisk normalfordeling med en middelværdi og en spredning repræsentativ for alle stammer er derfor meget krævende når der er mange stammer med forskellige egenskaber.

- d) Implementering i industrien og formidling af viden. Projektet er blevet formidlet til en bred vifte af personer repræsenterende både mejeriindustrien, forskere, og rådgivere. Se detaljer under punkt I. Modellen er kun valideret for et osteprodukt (blød blå/hvid ost), og derfor kræves yderligere validering for andre mejeriprodukter før at modellen kan anvendes mere generelt. I foråret 2013 afholdes på DHI en workshop for mejerier og andre interesserede, hvor modellen demonstreres, og interesserede kan få en udgave implementeret på deres PC.

#### **D. Samarbejdsrelationer mellem projektpartnere**

Projektet blev udført i tæt samarbejde mellem projektdeltagerne, et universitet (KU SUND), en virksomhed (DHI) og mejeriforeningen. Laboratoriarbejdet er udført på KU SUND, mens det meste skrivebordsarbejde er udført på DHI. Styregruppemøder blev organiseret af Mejeriforeningen to gange årlig, ved hvilke projektets foreløbige resultater blev fremlagt og diskuteret med repræsentanter fra industrien, Mejeriforeningen og forskere fra andre forskningsinstitutioner (KU, DTU og Århus universitet).

#### **E. Vurdering af projektets erhvervs- og samfundsmæssige betydning**

A: Erhvervsmæssig betydning

EU lovgivningen (EC 2073/2005) har opstillet mikrobielle fødevarerikkerheds kriterier for visse fødevarerpatogener forekomst i fødevarer. Koncentrationen af LM bakterier i fødevarer produceret i EU må ikke overskride 100 CFU/g i fødevarens holdbarhedsperiode. Fødevarerproducenterne er ansvarlige for at dokumentere at lovgivningen er overholdt, men eksisterende traditionelle metoder er ueffektive, og kostbare. Myndighederne tillader brug af effektiv prædiktiv mikrobiologi til at dokumentere at lovgivningen er overholdt, men mejerierne har manglet sådanne validerede modelværktøjer til at udnytte denne lovgivning. For andre typer af fødevarer eksisterer allerede validerede modelværktøjer, men hidtil har disse værktøjer ikke været præcise når det gælder osteprodukter. Resultaterne i dette projekt er imidlertid et væsentligt skridt i retning mod en generisk ostemodel og har bl.a. vist hvad der kræves af et modelværktøj for at kunne modellere vækst af LM i ost. Det er strengt nødvendigt at beskrive det dynamiske vækstmiljø i ost for at opnå præcision i model resultaterne for ost. Det der mangler i den udviklede model i dette projekt for at den kan anvendes generisk for alle oste og ikke kun for en specifik ost er imidlertid et valideringsstudie for mange oste typer. Forretningspotentialet er stort for en generisk anvendelig ostemodel. For det første kan mejerierne reducere time-to-market for produkt udvikling, og tilhørende omkostninger til dokumentation af fødevarerikkerhed. For det andet har mejerierne en stor interesse i at undgå fødevarer skandaler, som kan være uhyre kostbare, og værktøjer der medvirker til at øge fødevarerikkerheden er derfor meget værd, selvom det er vanskeligt at prissætte. Mejerier der har dokumenteret fødevarerikkerheden af deres produkter med prædiktiv mikrobiologi vil i fremtiden formentlig have en markedsførings fordel i forhold til konkurrenter der ikke har, da det er et kvalitetsstempel. Selvom der ikke er kommet noget direkte kommercielt ud af dette projekt, så betyder resultaterne i dette projekt at mejerierne er kommet væsentlig tættere på at få et generisk modelværktøj, der kan bruges til at simulere LM i ost, og dermed høste ovennævnte fordele.

## B: Samfundsmæssig betydning

LM er en fødevarebåren patogen som i stigende grad forårsager problemer med fødevarerens sikkerhed globalt. LM er særligt et problem i RTE (ready-to-eat) fødevarer inklusiv bløde oste, hvor der har været adskillige sygdomsudbrud de senere år. LM er bakterien bag den alvorlige og ofte dødelige infektion kaldet listeriosis, som primært rammer folk med nedsat immunforsvar, specielt den ældre befolkning. I en tid hvor den demografiske udvikling i den vestlige verden går mod en stigende andel af ældre i befolkningen, er LM et vigtigt samfundsmæssigt problem, der må forventes at blive endnu vigtigere i fremtiden. Den udviklede model i dette projekt er et væsentligt skridt mod målet om udbredt anvendelse af prædiktiv mikrobiologi for oste produkter. Måske vil et valideringsstudie på et senere tidspunkt vise at den udviklede model faktisk kan anvendes generisk for flere oste typer. Under alle omstændigheder er vi med dette projekt kommet tættere på en generisk model, og dermed formentlig tættere på mere sikre osteprodukter idet vi er blevet klogere på hvordan LM opfører sig i ost.

## F. Redegørelse for forskeruddannelse og nationale og internationale samarbejdsrelationer til offentlige og private forskningsmiljøer, erhverv m.m.

Projektet har uddannet en PhD studerende: Per Sand Rosshaug, som har arbejdet på tværs af universitet, og erhvervsliv. Specielt har Arla Foods været behjælpelig med information om hvordan produktion af ost foregår på deres mejerier, og ved at bidrage med forsøgsoste til projektet. De halvårlige møder i mejeriforening med forskere fra KU, DTU, AAU har været en nyttig platform til at diskutere projektet på tværs af universiteter, og til at lære andre forskere på andre universiteter at kende. DHI som er et GTS institut har endvidere fået opbygget væsentlige kompetencer indenfor prædiktiv mikrobiologi i dette projekt.

Resumé på engelsk (abstract).

*Listeria monocytogenes* (LM) is a foodborne pathogen, which may cause the life threatening infection listeriosis. The prevalence of the disease has increased globally the last couple of years. Many foods can be a source of listeriosis, but of particular concern are Ready-To-Eat foodstuffs, which are not heat treated before intake and at the same time support the growth of LM, such as dairy products, deli, and different fresh and lightly preserved seafoods. The food business operators shall ensure that foodstuffs sold in for example the EU do not exceed 100 CFU/g throughout the shelf life of the product. The EU suggests the use of predictive microbiology to document the food safety of a food product. Predictive microbiology is a relatively young scientific discipline, and especially the dairies still need model tools enabling them to document food safety regarding LM in their products. Cheese is a complex and dynamic environment, varying in time and space, both chemically and physically, and for some cheeses LM can use this environment as a vehicle of growth. This study has shown that model tools for simulating growth of LM in cheese should be able to include and handle a dynamic growth environment. In this study a calibrated and validated predictive tertiary growth model of LM was developed for simulating the growth of LM in a soft blue white cheese. The model is based on secondary models developed from broth experiments describing the independent influence of NaCl, temperature, pH, and lactic acid on the growth of *L. monocytogenes*. The model results show that LM can grow up to 3.5 logs during the shelf life of the investigated soft blue white cheese, and this result stresses the necessity of high hygienic standards at the dairies.

## G. Redegørelse for projektets perspektiver:

Projektet har givet ny viden omkring modellering af LM i ost. Den udviklede model er i stand til

at simulere vækst af LM i en specifik ost, men muligvis også andre oste produkter. Der mangler et validerings studie med test af mange oste produkter for at afklare dette spørgsmål. Det overordnede mål på sigt er en generisk model der kan anvendes for alle oste produkter.

Vækst kinetikken i ost er muligvis ikke fuldt forstået. Der er i hvert fald i litteraturen spekulationer omkring andre forhold der muligvis kan have en styrende rolle for vækst af LM i ost, og som bør medtages i en generisk model af ost. Her tænkes på betydningen af reologiske egenskaber for forskellige ostetyper herunder specielt betydningen af vækstmediets fysiske struktur. Derudover menes bakteriosiner at kunne have en betydning specielt nisin, som produceres af mælkesyrebakterier, som findes i rigt mål i ost.

#### **H. Projektets økonomiske forløb**

Alle parter i projektet har opfyldt deres økonomiske tilsagn, og der har ikke været økonomiske afvigelser fra det opstillede budget.

#### **I. Liste over publikationer mm., der er et direkte resultat af projektet**

##### Accepterede publikationer

- Rosshaug,P.S., Detmer,A., Ingmer,H. and Halberg Larsen,M. (2012). Modelling the growth of *Listeria monocytogenes* in soft blue white cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* Accepted September 9th 2012
- PhD afhandling af Per Sand Rosshaug ved Københavns Universitet med titlen 'FoodMathModel, Predictive Model of *Listeria monocytogenes* in soft blue white cheese', forhåndsgodkendt d. 24. oktober 2012
- Rosshaug,P.S., Detmer,A., Ingmer,H. and Halberg Larsen,M. (2009). *Listeria* bakterier i virtuelle oste. *Mælkeritidende, Årg. 122, nr. 20 (2009)*

##### Planlagte publikationer

- Rosshaug P.S., Detmer A. , Ingmer H., Larsen M. H. An alternative method for estimation of bacterial maximum specific growth rate, *In prep*
- Rosshaug P.S., Detmer A. , Ingmer H., Larsen M. H. Modelling the growth of *Listeria monocytogenes* as function of NaCl and pH, *In prep*

##### Indlæg på konferencer og kongresser

- Poster: ISOPOL 2010 i Porto, Portugal.
- Poster: Food Micro 2010 i København
- LMC 2011 i Helsingør. Poster + mundtlig præsentation.
- DHI Innovationsdag 2011. Poster inkl. præsentation (vinder af konkurrencen om bedste mundtlige præsentation af poster)
- Mejeriforskningens dag, Billund 2011. Mundtligt indlæg om FoodMathModel

##### Anden formidling

- Indlæg om projektet i mikrobiologi gruppen hos Mejeriernes Forskningsfond ca. hvert halve år ved skiftende lokaliteter

- 1.KU Life på Frederiksberg d. 29. september 2009
- 2.Aarhus Universitet Foulum i Tjele d. 20. april 2010
- 3.DHI i Hørsholm, d. 26. okt. 2010
- 4.Thise mejeri i Lemvig, d. 12. april 2011
- 5.Agro Food Park i Skejby, tirsdag d. 15. maj 2012)

- Præsentationer og foredrag hos Arla Foods og Københavns Universitet:

- 1.KU Life, Mikrobiologi gruppen, Foredrag om FoodMathModel, Feb 2010
- 2.KU Life, Mikrobiologi gruppen, Foredrag om Accuracy of estimation methods of maximum specific growth rate, Nov. 2011
- 3.Arla Foods, Præsentation, Sluseholmen, 7. Dec. 2009
- 4.Arla Foods,Præsentation på Temadag. Helnan Aarslev Hotel, Brabrand, 26. Jan. 2010
- 5.Arla Foods, Præsentation, Sluseholmen, 20. Jan. 2011

## **J. Uddybende beskrivelse af projektets forløb og opnåede resultater**

I dette projekt er det lykkedes at udvikle et matematisk modelleringsværktøj, der kan forudsige vækst af LM i ost ud fra det grundlæggende indbyggede princip at en mikroorganismes vækst i et givent miljø er reproducerbart. Dermed kan en mikroorganismes potentielle vækst forudsiges, hvis det omgivende miljø er bestemt. Det har derfor været en vigtig del i dette projekt at måle vækstmiljøet i ost. Modellen er baseret på sekundære modeller udviklet for data fra bouillon-forsøg. De sekundære modeller beskriver indflydelsen af NaCl, temperatur, pH og mælkesyre på væksten af LM. Modellen er efterfølgende blevet kalibreret og valideret for data baseret på vækstforsøg i en specifik blød blå/hvid ost. Ost udgør et kompliceret og dynamisk miljø, som varierer i tid og rum, både kemisk og fysisk, og hvor LM potentielt kan vokse i mange tilfælde. Det meget dynamiske vækstmiljø i blød blå/hvid ost er blevet målt i projektet og indføjet i modellen, hvilket viste sig at være en nødvendighed for at opnå tilfredsstillende nøjagtighed i modelresultaterne. Specielt har det vist sig at pH dynamikken har en meget afgørende rolle for væksten af LM i ost. Den anvendte metode med at benytte mikrosensorer (Unisense) til at måle pH gradienter i ost viste sig at være velegnet, da de anvendte oste i dette projekt havde tilstrækkelig blødhed til at det er muligt at benytte de hårtynede mikrosensor glasnåle. Modeludviklingen er beskrevet i en PhD afhandling (af Per Sand Rosshaug) omfattende en rammeberetning og 3 publikationer af hvilke den artikel der beskriver modellen er blevet publiceret i Applied and Environmental Microbiology (Modelling the growth of *Listeria monocytogenes* in soft blue white cheese by Per Rosshaug, Ann Detmer, Hanne Ingmer, and Marianne Larsen). Overordnet kan det på baggrund af dette projekt konkluderes at den udviklede model kan håndtere det dynamiske vækstmiljø i ost inkl. temperatur, pH, saltindhold og mælkesyre beskrevet over tid som tidsserier, og at model resultaterne er tilfredsstillende nøjagtige. Modelresultaterne, når der anvendes realistiske produktions og opbevarings forhold viser, at LM kan forøge sig 3-3½ log indenfor den undersøgte osts holdbarhedstid. Ved produktion af denne ost er det altså vigtigt at undgå kontamination med LM. Prædiktiv mikrobiologi er en relativ ung disciplin, og arbejdsgange og metoder er ikke så konsoliderede endnu. Der er derfor grund til at være forsigtig med at anvende metoder og antagelser ukritisk. De to andre artikler omhandler både analyse og validering af eksisterende antagelser og metoder anvendt i prædiktiv mikrobiologi. Artiklerne er ikke blevet accepteret



endnu. Vi undersøgte eksempelvis nøjagtigheden af forskellige estimeringsmetoder for maksimal specifik vækstrate for batchforsøg for at vælge den mest velegnede metode til at analysere vores målte data. I litteraturen findes adskillige metoder til at bestemme maksimal specifik vækstrate ud fra et batch-forsøg, og i dette studie er nogle af de mest anvendte metoder blevet analyseret mht. nøjagtighed. Analysen viste, at estimererne fra de eksisterende metoder varierer overraskende meget, og at de fleste er tendentiøse, hvilket gør estimererne svære at sammenligne. Vi introducerede en alternativ estimeringsmetode, som ikke er tendentiøs, ikke engang ved små vækstrater. Vækstraterne i projektets batch-forsøg er blevet estimeret med den nye metode.

I en anden artikel er LeMarcs tilgang til kvantificering af synergistiske effekter mellem miljøfaktorer på vækstraten blevet valideret med en anden kombination af miljøfaktorer end dem LeMarc brugte selv. De nye data konfirmerer at der er synergieffekter af pH og salt tæt ved grænsen for tilvækst. Data indikerer også, at synergistiske effekter for LM starter på et lavere kombineret stressniveau end beskrevet i den udbredte LeMarc ligning, og at en modificeret, fleksibel udgave af LeMarc ligningen til at kvantificere den synergistiske påvirkning er et brugbart værktøj for at beskrive den kombinerede hæmmende indflydelse fra flere miljø faktorer.

**9. Underskrifter og dato** (suppleret med navn, titel og institution/virksomhed i  
blokbogstaver)

Husk at der skal være en underskrift fra alle deltagende virksomheder/institutioner i  
projektet.

\_\_\_\_Hørsholm\_\_\_\_ den 7.november 2012\_\_\_\_



Ann Detmer, Seniortoksikolog, DHI Miljø og Sundhed

\_\_\_\_ den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_ den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_ den \_\_\_\_\_