



Slutrapport

Udvidelse af Listeria-model

28. december 2013
Proj.nr.2000216
Version 01
AGG/JUSS

Annemarie Gunvig

Baggrund

Indledning

Den eksisterende Listeria model ønskes udvidet, så der kan prædikteres vækst af *L. monocytogenes* i produkter med 1-9% salt i vand og som opbevares ved skiftende temperaturer. Det gøres ved, at der udføres podeforsøg med *L. monocytogenes* i produkter med salt i vandkoncentrationer i det udvidede område, samt at produkter lagres ved skiftende temperaturer. Resultaterne herfra anvendes til at optimere den neurale netværksmodel for den eksisterende Listeria-model. Afslutningsvist skal den udvidede model valideres i forhold de nye funktioner. Det gøres ved at sammenligne observerede resultater fra podeforsøg i produkter, der dels har et saltindhold svarende til værdier i det udvidede interval og dels er opbevaret ved skiftende temperaturer, med de tilsvarende prædikterede resultater fra den udvidede Listeria-model.

Modellen valideres ved at beregne "bias factor" (ligning 1), som indikerer, om modellen systematisk over- eller underprædikterer, og "accuracy factor", som er et mål for den gennemsnitlige fejl (ligning 2). En "bias factor" på mere end 1 indikerer en "fejlsikker" (fail safe) model, da den prædikterer en større væksthastighed, end der kan måles, mens en "bias factor" på mindre end 1 angiver en "fejlfarlig" (fail dangerous) model, svarende til, at den prædikterede væksthastighed er lavere end den målte. "Bias factor" angiver ikke, hvor præcist modellen prædikterer. Til vurdering af præcision anvendes "accuracy factor".

Formål

Formålet er at udvide DMRI's listeria-model, så den også kan anvendes på ikke-varmebehandlede kødprodukter, ved skiftende temperaturer samt et bredere salt-i-vand interval.

Konklusion

Version 2.1. af Listeria modellen kan prædiktere vækst i intervallet fra 1,2-9% salt i vand og ved skiftende temperaturer. Intervaller for de øvrige variabler er uændret.

Den udvidede Listeria-model har en bias factor 1,06

(~gennemsnitlig overprædiction på 6%) og accuracy factor=1,51. Valideringsresultatet viser, at den udvidede model kategoriseres som god, svarende til højeste kategori. Præcisionen er god, svarende til, at den i gennemsnit prædikerer inden for et interval på $\mu_{\max}/1,51$ og $\mu_{\max}*1,51$.

Den udvidede Listeria-model er optimeret i det tidligere gyldighedsområde, svarende til, at den har en lavere bias factor.

Version 2.1 kan ikke anvendes til prædiction af vækst af *L. monocytogenes* i ikke-varmebehandlede produkter, da der er mulighed for hæmning af Listeria ved forekomst af baggrundsflora, svarende til, at modellens output vil resultere i kraftig overprædiction.

Version 2.1 af Listeria model er implementeret på <http://dmripredict.dk>.

Baggrund

Indledning

Den eksisterende Listeria model ønskes udvidet, så der kan prædikeret vækst af *L. monocytogenes* i produkter med 1-9% salt i vand og som opbevares ved skiftende temperaturer. Det gøres ved, at der udføres podeforsøg med *L. monocytogenes* i produkter med salt-i-vand koncentrationer i den udvidede område, samt at produkter lagres ved skiftende temperaturer. Resultaterne herfra anvendes til at optimere den neurale netværksmodel for den eksisterende Listeria-model. Afslutningsvist skal den udvidede model valideres i forhold de nye funktioner. Det gøres ved at sammenligne observerede resultater fra podeforsøg i produkter, der dels har et saltindhold svarende til værdier i det udvidede interval og dels er opbevaret ved skiftende temperaturer, med de tilsvarende prædikerede resultater fra den udvidede Listeria-model.

Modellen valideres ved at beregne "bias factor" (ligning 1), som indikerer, om modellen systematisk over- eller underprædikerer, og "accuracy factor", som er et mål for den gennemsnitlige fejl (ligning 2). En "bias factor" på mere end 1 indikerer en "fejlsikker" (fail safe) model, da den prædikerer en større væksthastighed, end der kan måles, mens en "bias factor" på mindre end 1 angiver en "fejlfarlig" (fail dangerous) model, svarende til, at den prædikerede værdi er lavere væksthastighed end den målte. "Bias factor" angiver ikke, hvor præcist modellen prædikerer. Til vurdering af præcision anvendes "accuracy factor".

Formål

Formålet er at udvide DMRI's listeria-model, så den også kan anvendes på ikke-varmebehandlede kødprodukter, ved skiftende temperatur samt et bredere salt-i-vand interval.

Fremgangsmåde

Beregning af bias factor

$$\text{Bias factor} = 10^{(\sum \log(\frac{red_{pred}}{red_{obs}})/n)} \quad (\text{Ligning 1})$$

"Bias factor":

0,95-1,11 = god

0,87-0,95 eller 1,11-1,43 = acceptabel

<0,87 eller >1,43 = uacceptabel

(Ross, 1999)

Fx svarer "bias factor" på 0,87 og 1,43 til hhv. en under- og overprædiktions på 13% og 43%. Den ideelle model har en "bias factor" på 1.

Beregning af bias accuracy

$$\text{Accuracy factor} = 10^{(\sum \log(\frac{red_{pred}}{red_{obs}})/n)} \quad (\text{Ligning 2})$$

En "accuracy factor" på 1 indikerer, at der er perfekt overensstemmelse mellem prædikterede og observerede værdier. En "accuracy factor" er ifølge Ross (1996) en simpel multiplikativ faktor, der indikerer spredningen på resultatet fra prædiktionen. En "accuracy factor" på 2 angiver, at prædiktionen i gennemsnit er en faktor 2 fra den observerede værdi. F.eks. vil en prædiktions, der angiver væksthastighed på 0,02 log₁₀/h, ligge mellem 0,01 log₁₀/h (0,02 log₁₀/h / 2) og 0,04 log₁₀/h (0,02 log₁₀/h * 2) ved en "accuracy factor" på 2.

"Bias og accuracy factor" skal anvendes til en samlet vurdering af modellens performance, da modellen f.eks. kan have "bias factor" på 1, hvis data er balancerede imellem over- og underprædiktions. En sådan opførsel vil ofte blive indikeret med en høj "accuracy factor". Værdierne for bias og accuracy skal altid sammenholdes med et plot af observerede værdier mod prædikterede værdier.

Udvidede Listeria-model

Den oprindelige Listeria-model (version 1.3), som er tilgængelig på <http://dmripredict.dk> er en neural netværksmodel. Denne neurale netværksmodel er opdateret til version 2.1 i forhold til at kunne prædiktere i et bredere salt i vand (%) interval og ved skiftende temperaturer.

Version 2.1

Den nye model (version 2.1) er baseret på en neural netværksarkitektur med 7 input variable: Temperatur, pH, WPS (%), tilsat Natrium Nitrit (ppm, w/w), WPL (ppm), WPA og CO₂(%). I netværket er der endvidere 7 skjulte neuroner alle med sigmoid lignende overførings funktion.

$$\sigma(x) = \frac{1}{1 + \exp(-x)} - 0.5$$

Ved output neuronen benyttes også en sigmoid funktion. Modellen er udviklet på de oprindelige 447 trænedata (fra version 1), samt de nye udvidede data, i alt 47 nye væksthastigheder (salt < 1.6% og salt >6.6%) (Mansdal et al, 2013).

Valideringsdata

Data til validering af den udvidede model består af 2 datasæt. Valideringsdatasæt 1 (n=92) består af målte væksthastigheder for *L. monocytogenes* i produkter, som har et salt-i-vand (%) lavere end 1,6%. Data stammer dels fra marineringsprojektet (nr.18499) og dels fra nye podningsforsøg der specifikt er rettet mod validering af den udvidede model (Gunvig, 2013). Datasæt 1 indeholder også væksthastigheder målt i produkter med salt i vand (%) i intervallet 4-10%, hvilket overlapper det tidligere salt-i-vand (%) interval. Det skyldes, at det ikke i alle tilfælde har været muligt at ramme den ønskede saltkoncentration i de fremstillede produkter og at der medtaget enkelte virksomhedsfremstillede produkter. Derudover indeholder datasæt 1 produkter, der har været opbevaret ved skiftende temperaturer under lagringsforløbet. Valideringsdatasæt 2 består af de data, der blev anvendt til validering af version 1.3. Dette datasæt skal anvendes til kontrol af, at version 2.1 ikke prædikerer dårligere end version 1.3. i det oprindelige interval.

Beregning af μ_{max}

Væksthastigheden (μ_{max}) er beregnet enten ved hjælp af Microfit (version 2) (DMfit and Baranyi and Roberts, 1994)) eller ved lineær regression. Microfit programmet er anvendt, når der har været 5 eller flere tal-par (tid og log cfu) fra de enkelte poddeforsøg. Ved færre tal-par er der anvendt lineær regression for de talværdier, der er vurderet til at modsvare den eksponentielle vækstfase.

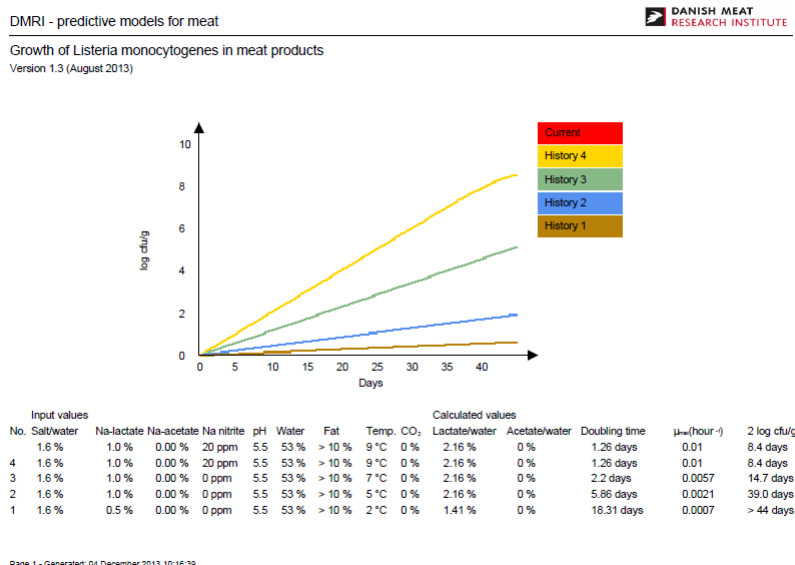
Sammenligning af observerede og prædikterede i den udvidede model

Væksthastigheder for *L. monocytogenes* er inddelt i fire kategorier. De fire kategorier er defineret på følgende måde:

- Nul vækst = $\sim \mu_{\max} (\log_{10} h^{-1}) \leq 0,0007$, svarende til at tid til 2 log cfu/g > 44 dage
- Lav vækst = $\sim 0,007 < \mu_{\max} (\log_{10} h^{-1}) \leq 0,0021$, svarende til at tid til 2 log cfu/g er mellem 39 og 44 dage
- Vækst = $\sim 0,0021 < \mu_{\max} (\log_{10} h^{-1}) = 0,0057$, svarende til at tid til 2 log cfu/g er mellem 14,7 og 39 dage
- Høj vækst = $\sim \mu_{\max} (\log_{10} h^{-1}) > 0,0057$, svarende til at tid til 2 log cfu/g under 14,7 dage

I figur 1 er vist vækstkurver svarende til ovenstående grænser.

Grænserne er anvendt til at fastlægge om prædikterede og observerede værdier i valideringsdatasættet resulterer i samme kategori for vækst.



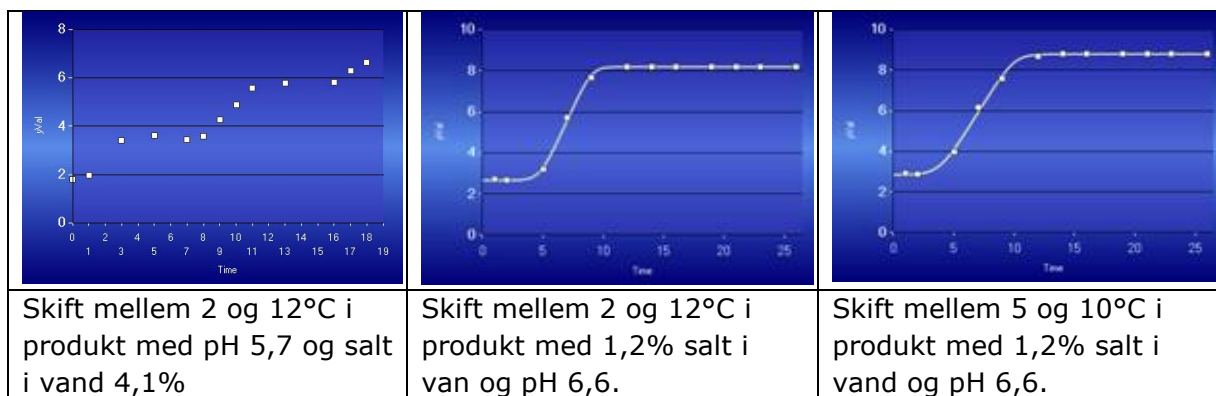
Figur 1. Illustration af væksthastigheder til kategorisering af 0-vækst, lav vækst, vækst og høj vækst.

Skiftende temperaturer

Resultater

Lagringsforsøg med skiftende temperaturer har vist, at væksthastigheden for *L. monocytogenes* tilpasses den pågældende temperatur uden nølefase ved skift fra både høj til lav temperaturer og omvendt. I modellen angives den samlede vækst som summen af vækst ved de enkelte temperaturer.

I figur 2 ses eksempler på skift af væksthastighed ved skiftende temperatur



Figur 2. Eksempler på vækst af *L. monocytogenes* ved lagring ved skiftende temperatur.

**Udvidede model
Validering af versio-
n 2.1 med valide-
ringsdatasæt
1+2(N=156)**

Tabel 1. Sammenligning af observerede og prædikterede væksthastigheder for *L. monocytogenes* fra version 2.1, inddelt efter kategori for nul-vækst, lav vækst, vækst og høj vækst (N=156)

	0-vækst (målt)	Lav vækst (målt)	Vækst (målt)	Høj vækst (målt)
0-vækst (pred)	43	7	2	0
Lav vækst (pred)	19	7	3	1
Vækst (pred)	4	4	18	16
Høj vækst (pred)	0	3	5	24

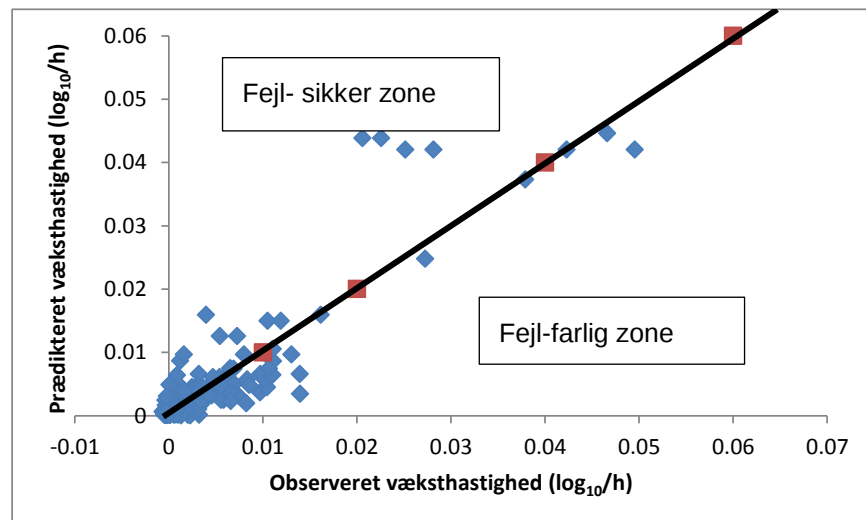
Ved sammenligning af observerede og prædikterede væksthastigheder er det optimale resultat, at både den observerede og prædikteret væksthastighed placeres i samme kategori. Det vil svare til, at alle resultaterne skulle være placeret langs den skrå linje i tabel 1.

Antallet af kombinationer, som er placeret *over* den blå streg i tabellen kategoriseres som *fejlfarlig*, svarende til at modellen prædikterer *lavere* vækst end der er observeret. Som det fremgår af tabel 1, er det få kombinationer, som placeres i dette område. I de 16 kombinationer, hvor der prædikteres vækst, men måles høj vækst, er vækst af en størrelsesorden, som ikke vil anvendes, hvis der ønskes en holdbarhed på fx 28 dage. Derfor tillægges denne fejl ikke så stor betydning.

Antallet af kombinationer, som er placeret *under* den blå streg i tabellen kategoriseres som *fejlsikker*, svarende til, at modellen prædikterer *højere* vækst, end der er observeret. Her er resultatet også tilfredsstillende, da relativt få kombinationer placeres her. Der er dog tendens til, at modellen overprædikterer ved væksthastigheder under $0,0021 \log_{10} h^{-1}$.

I figur 3 er alle prædikterede væksthastigheder vist som funktion af observerede værdier. Som det ses i figuren, er der generelt minimale forskelle mellem prædikterede og observerede værdier.

De fire største afvigelser er placeret i "fejlsikker" zonen.



Figur 3. Prædikeret væksthastighed (blå diamant) som funktion af observeret væksthastighed. Den sorte linje angiver det optimale resultat.

Oprindelig model
Validering af version 1.3 med valideringsdatasæt fra version 1.3 (N=64)

Tabel 2. Sammenligning af observerede og prædikerede væksthastigheder for *L. monocytogenes* fra version 1.3, inddelt efter kategori for nul-vækst, lav vækst, vækst og høj vækst (N=64)

	0-vækst (målt)	Lav vækst (målt)	Vækst (målt)	Høj vækst (målt)
0-vækst (pred)	37	0	0	1
Lav vækst (pred)	7	6	0	3
Vækst (pred)	0	0	0	0
Høj vækst (pred)	1	0	0	9

Udvidet model
Validering af version 2.1 med valideringsdatasæt fra version 1.3 (N=64)

Tabel 3. Sammenligning af observerede og prædikerede væksthastigheder for *L. monocytogenes* fra version 2.1, inddelt efter kategori for nul-vækst, lav vækst, vækst og høj vækst (N=64)

	0-vækst (målt)	Lav vækst (målt)	Vækst (målt)	Høj vækst (målt)
0-vækst (pred)	40	0	0	0
Lav vækst (pred)	3	6	0	5
Vækst (pred)	0	0	0	0
Høj vækst (pred)	1	0	0	9

I tabel 2 og 3 ses, at hovedparten af de testede kombinationer er placeret langs den optimale linje (blå streg). I forbindelse med udvidelse af modellen kan det ikke undgås, at det oprindelige gyldighedsområde også ændres. I tabel 3 ses, at forskellen mellem observerede og prædikterede kombinationer i fejlfarlig zone er minimeret, hvilket betyder, at modellen er optimeret. I fejlsikkerzonen er der én markant afvigelse.

Bias factor, accuracy factor og bias

Tabel 4. Bias factor og accuracy factor for version 1.3 og 2.1.

Område	Datasæt	N	Bias factor	Accuracy factor	Vurdering
Version 1.3	Version 1	64	1.22	1.46	Acceptabel
Version 2.1	Version 1	64	1.17	1.37	Acceptabel
Version 2.1	Version 1+2	156	1.06	1.51	God

I tabel 4 ses, at bias factor er reduceret fra 1,22 til 1,17 i gyldighedsområdet for version 1.3. Det betyder, at modellen er optimeret og at den udvidede model i gennemsnit overprædikterer med 17% mod tidligere 22%. Ligeledes er accuracy faktoren også reduceret, hvilket svarer til, at præcisionen er forbedret for det oprindelige gyldighedsområde i version 2.1.

Den samlede validering af den udvidede model viser, at version 2.1 overprædikterer med 6% i den udvidede version (=bias factor på 1,06, se tabel 4), svarende til, at den placeres i kategorien "god", som er den højeste kategori. Accuracy faktoren er beregnet til 1,5, hvilket stadig er tilfredsstillende, da der generelt ikke er markante forskelle imellem prædikterede og observerede væksthastigheder i området mellem nulvækst og lav vækst ($\sim \mu_{\max} (\log_{10} h^{-1}) \leq 0,002$) (se også figur 3).

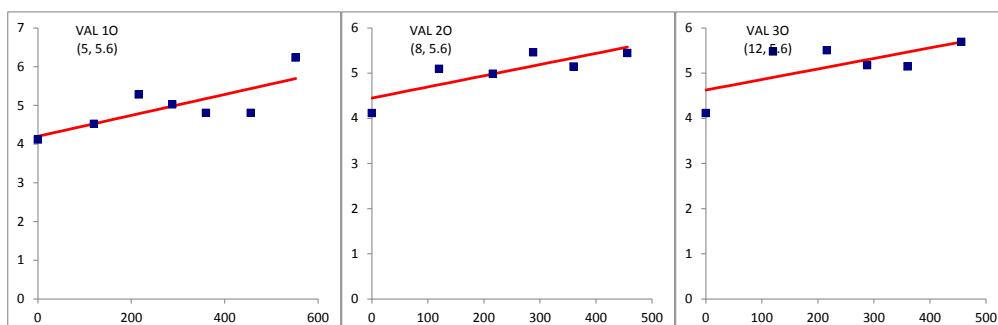
Anvendelse af version til 2.1 til ikke varmebehandlede produkter

I forbindelse med valideringen af modellen blev der fremstillet produkter tilsat saltlage, svarende til 1-2% salt i vand, samt podet med *L. monocytogenes* og lagret ved forskellige temperaturer (~ ikke varmebehandlet). Resultaterne viste, at væksten af *Listeria monocytogenes* var langt under det forventede. I figur 4 ses vækstkurver for *L. monocytogenes* i ikke-varmebehandlet svinekam med 2% salt i vand, pH=5,6 og lagret ved hhv. 5 (val 10), 8 (val 20) og 12°C (val 20), og her ses, at væksten er kraftigt hæmmet.

I disse forsøg blev der samtidigt bestemt total kimtal ved start og slut af lagringsforløbet. Som det fremgår af tabel 5 var niveauet for totalkim så højt, at det har haft en væksthæmmende effekt på *L. monocytogenes*. Hæmningen kan skyldes, at floraen har indeholdt bacteriocin producerende stammer. På baggrund af ovenstående, kan det ikke anbefales, at den udvidede model anvendes til prædiktion af vækst af *L. monocytogenes* i ikke varmebehandlede produkter.

Tabel 5. Total kimtal (TVC) for svinekam med pH 5,6 og 2% salt i vand lagret ved hhv. 5, 8, og 12°C.

Temperatur	TVC (log cfu/g) Dag 0	TVC (log cfu/g) Dag 19	TVC (log cfu/g) Dag 23
5	4.3		8.5
8	4.3	8.2	
12	4.3	8.7	



Figur 4. Vækst af *L. monocytogenes* i ikke-varmebehandlet svinekam med 2% salt i vand, pH=5,6 og lagret ved hhv. 5 (val 10), 8 (val 20) og 12°C (val 20).

Konklusion

Version 2.1. af Listeria modellen kan prædiktere vækst i intervallet fra 1,2-9% salt i vand og ved skiftende temperaturer. Intervaller for de øvrige variabler er uændret.

Den udvidede Listeriamodel har en bias factor 1,06 (~gennemsnitlig overprædiktions på 6%) og accuracy factor=1,51. Valideringsresultatet viser, at den udvidede model kategoriseres som god, svarende til højeste kategori

Den udvidede Listeriamodel er optimeret i det tidligere gyldighedsområde, svarende til, at den har en lavere bias factor.

Version 2.1 kan ikke anvendes til prædiktions af vækst af *L. monocytogenes* i ikke-varmebehandlede produkter, da der er mulighed for hæmning af Listeria ved forekomst af baggrundsflora, svarende til, at modellens output vil resultere i kraftig overprædiktions.

Version 2.1 af Listeria model er implementeret på <http://dmripredict.dk>

Referencer

1. Baranyi, J. and Le Marc, Y. DMFit Version 2.0 (link)
2. Barnayi, J. and Roberts, T.A. (1994) A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int. J. Food Microbiol. 23, 277-294
3. Gunvig, A. 2013. 20130925 Data fra validering juni 2013. Excel ark. Proj. Nr. 200216, Validering, Data version 2.
4. Mansdal, S., Ludvigsen, H.; Larsen, L. og Gunvig, A. (2013). Vækstforsøg i kødmodel med nye konserveringsparametre samt lagring ved konstant og skiftende temperatur. Rapport proj. nr. 200216
5. Ross, T. (1999). Predictive Food Micro Models in Meat Industry. Meat and Livestock Australia, North Sydney, Australia, p. 196.
6. Ross, T. (1996) Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. J. of Applied Bacteriology, 81, 501-508