

HOUDBAARHEID

SPECIALISATIE BINNEN DE LEVENSMIDDELENMICROBIOLOGIE

RIJKELT BEUMER

Al tienduizenden jaren is er een relatie tussen levensmiddelen en micro-organismen. Zodra de mens zijn nomadenbestaan verruilde voor een vaste woonplaats, werd het nodig voedsel te kunnen bewaren in tijden van overvloed voor perioden van schaarste. Voedsel moest geconserveerd worden om groei van micro-organismen te remmen.

Water onttrekken door drogen van bijvoorbeeld fruit of granen lag het meest voor de hand als methode om voedsel te conserveren. Dat gebeurt ook nu nog op grote schaal bij de productie van melk- en eipoeder. Het binden van water door toevoegen van zout (pekelen) gebeurt tegenwoordig minder vaak. Zout wordt nog wel toegevoegd om de groei van micro-organismen te remmen, maar niet in hoeveelheden die de groei stoppen. Andere oude conserveringsmethoden zijn het bewaren in olie en het gecontroleerd laten bederven van levensmiddelen. Dit laatste noemt men tegenwoordig fermenteren, een proces waarbij met hulp van micro-organismen fruit (wijn), granen (bier), groenten (zuurkool), melk (kaas), vlees (salami) en vis (nam-pla, vissaus) worden omgezet in langer houdbare producten die soms ook beter smaken.

Naast het nuttige effect van micro-organismen (fermentatie) en de last die ze veroorzaken (bederf) werd later duidelijk dat ze ook gevaarlijk kunnen zijn door het veroorzaken van ziekte. In de Griekse en Romeinse tijd werd al melding gemaakt van voedselvergiftigingen veroorzaakt door het eten van besmet graan. Pas veel later werd het verband gelegd tussen de groei van een schimmel op het graan en de productie van toxinen. Omdat de oorzaak van veel ziekteverschijnselen niet bekend was, werden steeds weer dezelfde fouten gemaakt. Leo IV (ca. 750-780), keizer van Byzantium, verbood het produceren van een bepaald soort bloedworst op straffe van verbanning en een hoge boete. Ruim elfhonderd jaar later, in 1896, beschrijft professor Van Ermengem in een artikel van ruim vijftig pagina's zeer nauwgezet de ziekteverschijnselen die optreden bij een groep mensen na het eten van bloedworst. Hij isoleerde het verantwoordelijke micro-organisme, noemde dat *Bacterium* – later zou deze bacterie de naam *Clostridium botulinum* krijgen – en liet de stam als reincultuur groeien. Verder bepaalde hij de maximale zoutconcentratie waarbij de stam nog kon groeien, en spoot hij het geproduceerde toxine in bij muizen, konijnen en katten en nam daarna dezelfde verschijnselen waar die optraden bij de mensen die van de besmette bloedworst aten.

Circa honderd jaar eerder had Napoleon problemen met het bevoorraden van zijn legers. Hij schreef een prijsvraag uit voor een nieuwe conserveringsmethode. Nicolas Appert won de prijs met zijn voorstel levensmiddelen in grote glazen potten te verhitten in kokend water. Het is wel grappig dat al honderd jaar voor Appert Antonie van Leeuwenhoek micro-organismen zag met zijn zelfgebouwde microscopen. En dat het, na Appert, nog ongeveer vijftig jaar duurde voordat Louis Pasteur bewees dat bacteriën werden gedood door verhitting. Pasteur legde een wetenschappelijke basis onder de conserveermethoden gebaseerd op verhitten. Hiermee, en met zijn onderzoek naar de rol van micro-organismen bij de bereiding van bier en wijn, stond hij aan de wieg van de huidige levensmiddelenmicrobiologie. Pasteurs tijdgenoot Koch ontwikkelde methoden om bacteriën in reincultuur te kweken, en was toen in staat specifieke ziektes te associëren met bepaalde bacteriën. Daarna ontwikkelde deze tak van biologie zich snel. Veel van de ook nu nog steeds gevreesde voedselpathogenen (*Campylobacter*, *Salmonella*, *Vibrio*) werden al aan het eind van de negentiende eeuw geïsoleerd en beschreven.

Tot in de jaren zestig van de vorige eeuw veranderde er niet wezen-

lijk veel na het baanbrekende werk van Pasteur. Natuurlijk waren er ontwikkelingen in het kweken van bacteriën: kweekvloeistoffen (bouillons) werden vaste media met behulp van gelatine, en later met agar. En meer en meer werd aandacht geschonken aan het standaardiseren van voedingsmedia, zodat de verkregen resultaten betrouwbaarder werden. Vanaf die tijd ontwikkelt de levensmiddelenmicrobiologie zich op een aantal fronten: het detecteren van micro-organismen, het conserveren van levensmiddelen, het hygiënisch werken en de fysiologie en genetica van micro-organismen.

Met de klassieke, tijdrovende methoden voor het aantonen van ziekteverwekkers, werd een hoeveelheid product vermengd met een steriele bouillon, bebroed en vervolgens afgestreken op een selectief medium, dat weer bebroed moest worden. Verdachte kolonies moesten daarna bevestigd worden, en dat kon weer een paar dagen duren. Al met al duurde dit een week of langer, en vaak was het product dan al in de markt. De nieuwe methoden zijn gebaseerd op immunologie of op DNA-technieken. Met immunologische technieken worden specifieke antilichamen geproduceerd tegen pathogene micro-organismen. In veel testen zijn deze gecoat op de wand van een buisje of cupje. Wanneer een kleine hoeveelheid ophopingsbouillon wordt toegevoegd aan het cupje, zullen de daarin aanwezige specifieke pathogenen zich binden aan de antilichamen, en kan hun aanwezigheid aangetoond worden. Een nadeel van immunologische methoden is dat zich kruisreacties kunnen voordoen. Andere bacteriën dan de gezochte soort binden zich aan het antilichaam, en zorgen zo voor een valse positieve reactie. Valse negatieve reacties kunnen ontstaan wanneer er niet voldoende doelorganismen in de bouillon zijn gegroeid (10^5 - 10^7 per ml).

De op DNA-technieken gebaseerde methoden zijn veel specifiek, en kunnen, afhankelijk van het onderzochte product, al resultaten opleveren met 10^3 - 10^5 cellen per ml. Het principe berust op het isoleren van DNA uit de doelorganismen. Met de polymerasekettingreactie, vaak afgekort tot PCR (van Polymerase Chain Reaction), worden zeer kleine hoeveelheden DNA die heel specifiek zijn voor het gezochte micro-organisme vermenigvuldigd, tot er genoeg van is om het te analyseren. Een groot nadeel van DNA-technieken is dat deze ook het DNA afkomstig van dode cellen aantonen. Er is dus altijd een ophopingsstap nodig om een voldoende hoge concentratie aan levende cellen te krijgen. Een nadeel van zowel immunologie als PCR-technieken is dat men bij een positieve reactie alleen het signaal heeft en niet het micro-organisme. Het is altijd beter het levende micro-organisme in handen te hebben. Men weet dan zeker dat het geen vals positief signaal was, en men kan dan het geïsoleerde micro-organisme onderzoeken op allerlei eigenschappen.

DOORBRAAK

Er kwam een doorbraak bij het conserveren van levensmiddelen toen er onderzoek werd gedaan naar de groeifactoren van micro-organismen, en men deze in verband bracht met het bederf van levensmiddelen. Intrinsieke factoren, factoren die iets zeggen over een levensmiddel, zoals de structuur, de zuurgraad, de hoeveelheid water die beschikbaar is voor micro-organismen (wateractiviteit)

en de aanwezigheid van conserveermiddelen bepalen in belangrijke mate de groei van bederfverwekkers en pathogenen. Ook extrinsieke factoren, de omstandigheden waaronder een levensmiddel wordt bewaard, zijn van belang voor de ontwikkeling van micro-organismen. De bewaartemperatuur, de relatieve vochtigheid en of de producten verpakt zijn onder een gewijzigde atmosfeer (vacuüm, stikstof of een mengsel van koolzuurgas en stikstof) behoren tot deze groep. Verder spelen de micro-organismen zelf ook een rol: snelle groeiers kapen het voedsel weg voor de begeleidende microflora, waardoor die zich minder goed kunnen ontwikkelen. Antagonisme (tegenwerking) en synergisme (samenwerking) zijn ook mooie voorbeelden van de interactie van micro-organismen. Lactobacillen bijvoorbeeld produceren melkzuur uit suikers. Hierdoor daalt de zuurgraad (pH) en kunnen andere micro-organismen minder goed of helemaal niet meer groeien. Zo wordt zuurkool, gesneden witte kool waarin de suikers worden omgezet door melkzuurbacteriën, een microbiologisch veilig product. Een mooi voorbeeld van synergisme is als het ene micro-organisme een stof afbreekt (eiwit, cellulose), waardoor andere micro-organismen kunnen groeien door het verder afbreken van die brokstukken. Als laatste moeten de procesfactoren worden genoemd: pasteuriseren en steriliseren waarbij een deel van, of alle micro-organismen worden gedood, hebben een groot effect op de houdbaarheid van levensmiddelen. Snijden en malen worden ook wel tot de procesfactoren gerekend. Tijdens deze processen wordt de structuur van producten beschadigd waarbij het voedselrijke binnenste van cellen vrijkomt, waarop micro-organismen zich snel kunnen ontwikkelen. Meestal wordt niet gebruik gemaakt van slechts één van bovengenoemde (bederf)factoren. Vaak leidt dit tot forse smaakafwijkingen. Daarom wordt gezocht naar een combinatie van factoren. Melk wordt bijvoorbeeld gepasteuriseerd en koel bewaard. Huzarensalade bevat mayonaise (verlaagt de pH), een conserveermiddel (om melkzuurbacteriën en gisten te remmen) en wordt in de koelkast bewaard. Het zoeken naar een optimale combinatie van factoren voor het zo lang mogelijk bewaren van levensmiddelen wordt hordentechnologie genoemd.

Vanaf de jaren zestig in de vorige eeuw kwamen er ook veel ontwikkelingen op het gebied van hygiëne. Over hygiënische manieren van produceren, vaak aangeduid als GMP (van Good Manufacturing Practices) was al veel gepubliceerd. Dit werd uitgebreid met HACCP, de afkorting voor Hazard Analysis and Critical Control Points, een risico-inventarisatie voor voedingsmiddelen. Bedrijven die zich bezighouden met de productie en bereiding van levensmiddelen moeten alle handelingen in het proces identificeren en op gevaaren analyseren. Dit controleproces, verplicht gesteld door de Europese Unie, moet ervoor zorgen dat het productieproces van alle voedingsmiddelen gepaard gaat met zo weinig mogelijk risico op besmetting met ziekteverwekkers. Het bewaken en registreren van de temperatuur van bijvoorbeeld koel- en vriescellen is hiermee verplicht geworden. Een verplichting, die vooral door onwillige en vaak ook onkundige personen binnen de horeca als onzinnig wordt bestempeld. HACCP heeft zijn oorsprong in de Amerikaanse ruimtevaart omdat het daar niet mogelijk is om met ziekteverwekkers besmet voedsel terug te sturen naar de fabriek en te vervangen door betere producten.

Een logisch vervolg op HACCP, waarmee risico's worden beperkt, is de risicoanalyse. Deze risicoanalyse werd gestandaardiseerd door de Codex Alimentarius, een wetenschappelijke procedure van de Wereld Handelsorganisatie (WHO), die aanraadt om deze risicoanalyse uit te voeren voor er, ten behoeve van de volksgezondheid, beslissingen worden genomen in verband met internationale productie, handel en bewerking van grondstoffen en levensmiddelen. Bij het uitvoeren van een risicoanalyse wordt aandacht besteed aan de drie basisstenen: risico-evaluatie (een onderdeel daarvan is HACCP), risicomangement (het implementeren van maatregelen, voornamelijk een taak van de overheid) en risicocommunicatie (het

geven van informatie, ook aan de consument). Met het verrichten van fysiologisch en genetisch onderzoek aan micro-organismen kan in veel gevallen het gedrag van micro-organismen verklaard worden. Zo werd bekend dat micro-organismen onder invloed van stress (bij lage pH, een lage of hoge temperatuur, als er te weinig nutriënten zijn, of in aanwezigheid van lage concentraties desinfectiemiddelen of antibiotica) een 'stress-response', (een reactie op de minder gunstige omstandigheden) hebben. In hun cellen worden dan bepaalde eiwitten geproduceerd, die voor bescherming zorgen. Of zoals de filosoof Nietzsche al zei: Was mich nicht umbringt, macht mich stärker (wat mij niet dood maakt, maakt mij sterker). Een ander onderzoeksterrein is dat van de signaalstoffen, waarmee micro-organismen met elkaar schijnen te communiceren.

MODELLEREN VAN PROCESSEN

Sinds circa 1990 wordt er veel gepubliceerd over het modelleren van microbiologische processen: groei, afsterving onder invloed van hitte, desinfectie of bestraling, en groeiremming door conserveermiddelen. Niet iedereen heeft voldoende parate kennis om het gedrag van micro-organismen te bepalen. Met de hulp van (eenvoudige) modellen, waarin bepaalde parameters (pH, wateractiviteit, temperatuur) gevarieerd kunnen worden, kan de groei van bederfverwekkers en pathogenen in een product voorspeld worden. Dit geeft niet-levensmiddelenmicrobiologen wat inzicht in dingen die gebeuren kunnen, en voor levensmiddelenmicrobiologen is het een handig hulpmiddel bij het plannen van onderzoek. Gebruikt men een model bijvoorbeeld voor het testen van de houdbaarheid van een product (bijvoorbeeld gerookte zalm) bij koelkasttemperatuur (7°C), dan voorspelt het model de groei van de bederforganismen. Ook al is dat niet juist, het geeft wel aan hoe de groei ongeveer verloopt. Nu is makkelijker te bepalen op welke tijden er monsters van de zalm genomen moeten worden om een meer betrouwbaar resultaat te verkrijgen. Een ander voorbeeld is het gebruik van modellen in een voedselketen. Kent men alle stadia van productie, opslag en distributie, met de bijbehorende tijden en temperaturen, dan is met een model heel makkelijk na te gaan welke stap de meeste invloed heeft op de groei van micro-organismen. Op deze stap kan men aanpassingen doen voor de temperatuur of de tijd om de houdbaarheid van een product te optimaliseren.

Met al deze ontwikkelingen werd de levensmiddelenmicrobiologie een echte wetenschap. De tijd waarin levensmiddelenmicrobiologen door (bio)chemici en procestechnologen nogal schamper werden uitgemaakt voor pietentellers is nu voorbij. Op elk van de genoemde gebieden specialiseren mensen zich, en iedereen claimt dat zijn of haar onderzoek bijdraagt aan de voedselveiligheid. Helaas heeft dat er nog niet toe geleid dat het aantal geregistreerde voedselinfecties en -vergiftigingen minder is geworden. Een reden hiervoor is dat door de vergaande specialisatie veel onderzoekers geen flauw benul hebben van wat zich afspeelt bij de industriële productie van levensmiddelen en de grootschalige bereiding van maaltijden. De eerste levensmiddelenmicrobiologen hadden die kennis nog wel. Zij telden bacteriën voor, tijdens en na productie, en na het reinigen en desinfecteren van de productie- en bereidingsruimten. Werden er te hoge aantallen gevonden, dan moest er beter schoongemaakt worden, of moest de houdbaarheid van producten verkort worden. Velen kenden het kunstje om veilig voedsel te produceren. De huidige en toekomstige generatie levensmiddelenmicrobiologen moet vooral niet vergeten dat kunstje te leren. Ondanks de grote hoeveelheid kennis die zij vergaren, en die het vakgebied tot wetenschap maakt, is juist het kennen van dat kunstje nog steeds het belangrijkste om veilig voedsel te produceren of te bereiden.

D† R.R. Beumer is verbonden aan de Food Microbiology Laboratory van Wageningen Universiteit.

