



Rapport

Semiforædlede produkter til foodservice

Vurdering af risici ved genopvarmning af sous vide-produkter og lagring ved køletemperaturer

Annemarie Gunvig

7. december 2017
Projektnr. 2004287
Version 1
AGG/MT

Baggrund	<p>Sammendrag</p> <p>I cateringsektoren anvendes sous vide-tilberedning af kød, og produkterne varmholdes, indtil bestillingerne tilgår køkkenet. I praksis sker der det, at produkter, som ikke er anvendt i løbet af dagen, bliver lagt på køl igen og genopvarmet senere. Derfor testes betydningen af gentagne opvarmninger og varmholdelser i svinekam podet med både <i>L. monocytogenes</i>- og psykrotrofe <i>C. botulinum</i>-sporer på overfladen og i centrum efter en usikker varmebehandling til 50°C i centrum med 10 minutters holdetid.</p> <p>Køddbranchen har ønsket mere viden om vækst af <i>C. botulinum</i> efter varmebehandling. Derfor gennemføres et lagringsforsøg ved 2, 5 og 8°C med svinekam podet med både <i>L. monocytogenes</i>- og psykrotrofe <i>C. botulinum</i>-sporer på overfladen og i centrum efter en varmebehandling ved 58°C i 72 minutter inden lagring.</p>
Formål	<p>Formålet er at fastlægge holdbarhed af sous vide-produkter varmebehandlet ved 58°C i 72 minutter og efterfølgende lagret ved hhv. 2, 5 og 8°C i forhold til vækst af evt. overlevende <i>L. monocytogenes</i> og <i>C. botulinum</i>.</p> <p>Desuden vurderes risici for vækst af <i>L. monocytogenes</i> og <i>C. botulinum</i> efter gentagne genopvarmninger til 58°C og varmholdelse i op til 3 timer.</p>
Konklusion	<ul style="list-style-type: none">• <i>C. botulinum</i> kan opformeres under kølelagring (5°C i mere end 5 dage) og under langsom opvarmning i sous vide-behandlet svinefilet, som har været genopvarmet én gang.• <i>C. botulinum</i> opformeres ikke under varmholdelse ved 58°C i 3 timer• Lagring ved 8°C giver kraftig bombage, hvilket indikerer kraftig vækst.

- Pga. forsøgstekniske problemer kan der ikke angives holdbarhedstider for opbevaring ved 2 og 5°C, men det anbefales at følge FSA's vejledninger
- *L. monocytogenes* er ingen risikofaktor i forbindelse med genopvarmning til 58°C efter en varmebehandling ved 58°C i 72 min.
- *L. monocytogenes* inaktiveres ikke ved varmebehandling ved 50°C i 10 min.

Anbefalinger

Ud fra disse resultater anbefales følgende for genopvarmning og lagring af sous vide-behandlet kød:

- Max. 1 genopvarmning efter lagring ved 5°C i max. 10 dage
- Max. 4 dages holdbarhed ved lagring ved 8°C
- Max. 10 dages holdbarhed ved lagring ved 5°C
- Max. 90 dages holdbarhed ved lagring ved 2°C

Baggrund

Indledning

På intakte kødudskæringer, som ikke er tilsat lage med multistiksprøjte, findes bakteriefloraen udelukkende på overfladen (Baldwin, 2011). Food Standard Agency (FSA) anbefaler, at produkter skal varmebehandles ved 90°C i 10 minutter, hvis holdbarhed af vakuum- og MA-pakkede produkter skal være længere end 10 dage ved 5-8°C. En forudsætning er, at produktet opbevares i den ubrudte emballage efter varmebehandling.

Baggrunden for ovenstående er, at sous vide-behandling ved temperaturer under 75°C kun inaktiverer vegetative celler, mens sporer overlever processen. DMRI anbefaler en 4 log reduktion af *L. monocytogenes* ($D_{60^\circ\text{C}}=8,7$ min. og $z=6,3^\circ\text{C}$) under varmebehandling (Gunvig, 2011), og at produkterne skal opbevares under 3,3°C for at forhindre vækst af non-proteolytiske bakterier (sporedannere). Ved opbevaring under 3,3°C har sous vide-behandlede produkter en holdbarhed på op til 31 dage (Peck, 1997). I Danmark er distributions- og opbevaringstemperaturen 5°C, hvor holdbarheden er under 10 dage, ifølge Peck, 1997. For at få en længere holdbarhed ved 5°C skal antallet af non-proteolytiske *C. botulinum* reduceres med 6 log. En 6 log reduktion af *C. botulinum* kan opnås med en varmebehandling ved 85°C i 25 minutter (Fernandez og Peck, 1999) eller den mere konservative varmebehandling på 90°C i 10 minutter ($z=7^\circ\text{C}$) (FDA) svarende til 95°C i 3,2 minutter eller 99°C i 1,3 minut ($z=10^\circ\text{C}$).

Køddbranchen har ønsket mere viden om vækst af *C. botulinum* efter varmebehandling. Derfor gennemføres et lagringsforsøg ved 2, 5 og 8°C med svinekam podet med både *L. monocytogenes*- og psykrotrofe *C. botulinum*-sporer på overfladen og i centrum efter en varmebehandling ved 58°C i 72 minutter inden lagring.

I cateringsektoren anvendes sous vide-tilberedning af kød, og produkterne varmholdes, indtil bestillingerne tilgår køkkenet. I praksis sker der det, at produkter, som ikke er anvendt i løbet af dagen, bliver lagt på køl igen og genopvarmet senere.

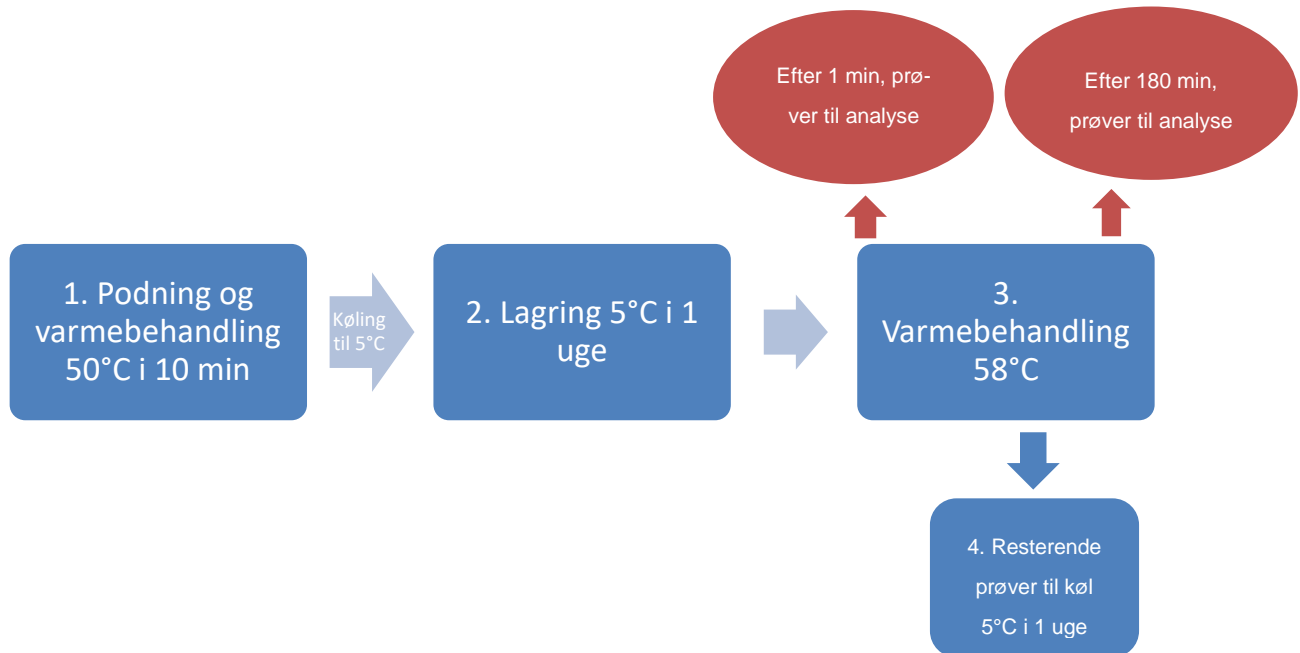
Hidtil har der ikke været nogen undersøgelser, der viser sporerens påvirkning af gentagende opvarmninger. Derfor testes svinekam podet med både *L. monocytogenes*- og psykrotrofe *C. botulinum*-sporer på overfladen og i centrum efter en usikker varmebehandling til 50°C i centrum med 10 minutters holdetid. Produkterne genopvarmes efterfølgende 3 gange til 58°C med ingen og 3 timers holdetid.

Formål

Formålet er at fastlægge holdbarhed af sous vide-produkter varmebehandlet ved 58°C i 72 minutter og efterfølgende lagret ved hhv. 2, 5 og 8°C i forhold til vækst af evt. overlevende *L. monocytogenes* og *C. botulinum*.

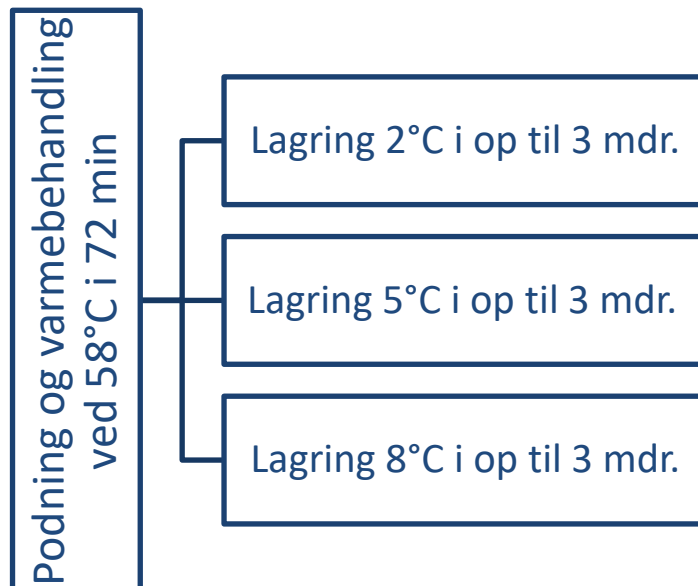
Desuden vurderes risici for vækst af *L. monocytogenes* og *C. botulinum* efter gentagne genopvarmninger til 58°C og varmeholdelse i op til 3 timer.

Forsøgsdesign, genopvarmningsforsøg



Pkt. 1-4 gentages 3 gange med uges mellemrum

Forsøgsdesign, lagring



Analyse af ikke-varmebehandlede prøver 9 gange under lagringsforløbet.

Kødprøver

Fremgangsmåde

Til forsøgene blev anvendt svinefilet (Japankam 1660), som blev udskåret i stykker af 15 cm. Stykkerne blev podet med en blanding af vegetative celler og sporer af *C. botulinum* og *L. monocytogenes*.

Table 1. Antal stykker svinefilet a 15 cm til podning med patogener og måling af tids- og temperaturprofil (dummy)

Delforsøg	Antal til podning	Antal dummy
Genopvarmning	40	4
Lagring	30	1
	30	1
	30	1

C. botulinum-stammer

Følgende fire *Clostridium botulinum*-stammer blev anvendt i podedcocktailen: DMRICC 3760PX, 3778 PX, 3779PX og 3780PX.

Ifølge Jacobsen, 2005 kan alle 4 stammer vokse ved 5°C efter podning i kød. Alle 4 stammer har en betydelig varmeresistens med $D_{90^{\circ}\text{C}}$ -værdier mellem 0,5 og 4,4 min. De 4 stammer producerer mere end 5 log sporer/ml efter 12 dages vækst i dobbelt CCM. Stammerne blev opformeret ifølge vejledning beskrevet i bilag 1, baseret på Peck et al. (1992).

L. monocytogenes-stammer og opformering

Til forsøget blev der anvendt en cocktail af følgende stammer:

- DMRICC 3012 PX (miljø)
- DMRICC 4106 PX (human)
- DMRICC 4124 PX (kød, serotype 1)
- DMRICC 4127 PX (pølse, serotype 4)
- DMRICC 4140 PX (bacon)

Kulturerne blev vækket i BHI-B ved 30°C natten over og efterfølgende udstreget på BHI-A (30°C i 24 h). Fra BHI-A agarplade blev en enkeltliggende koloni podet i BHI-bouillon og inkuberet natten over ved 37°C.

Kulturerne blev blandet i forholdet 1:1 (=cocktail) og fortyndet 10 gange. Kimtallet var ca. $0,5 \times 10^7$ cfu/ml.

Podning af prøver til lagringsforsøg

Cocktail af *L. monocytogenes* og *C. botulinum* blev fremstillet ved at blande *C. botulinum*-cocktail og *L. monocytogenes*-cocktail i forholdet 4:1 (=endelig podedcocktail). Der blev bestemt kimtal for listeria på Oxford-agar, samt vegetative celler og sporer på SFP-agar.

Trin 1

Podcocktail til podning i geometrisk centrum blev fremstillet ved at blande "endelig cocktail" med grøn frugtfarve fra Dr. Oetker i forholdet 12:1. I geometrisk centrum blev injiceret 0,1 ml af den farvede podcocktail.

Trin 2

Overfladen af kamfileten blev podet med $10^5/\text{cm}^2$ af *C. botulinum* og $10^6/\text{cm}^2$ af *L. monocytogenes*, ved at hvert stykke kamfilet blev placeret i sous vide-kogepose, der blev tilsat 2,5 ml på hver side, og prøven blev masseret i de i alt 5 ml endelig cocktail.

Umiddelbart efter podning blev prøverne vakuumpakket i sous vide-poser Cryovac CN300 250x300 (link til datablad kan ses i bilag 3) og lagt på køl (2°C), indtil varmebehandling blev igangsat.

Lagringsforsøg

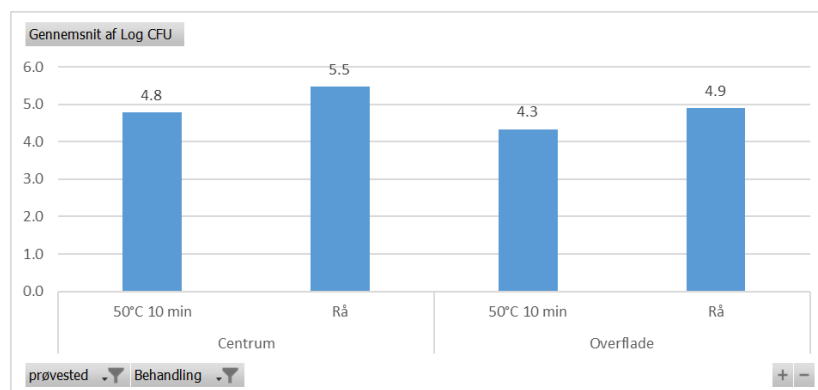
Varmebehandling

Prøver til lagringsforsøg blev opvarmet til 58°C i centrum med en efterfølgende holdetid på 72 minutter (svarende til DMRI's anbefalinger for sikker varmebehandling) uden delta T (max. temperatur på vandet var 59°C). Prøverne blev kølet i sous vide-karret og efterfølgende lagt på køl. Varmebehandlinger blev gennemført over 3 dage, og prøverne fra de 3 dage blev blandet, inden de blev fordelt til lagring ved hhv. 2, 5 og 8°C.

Genopvarmningsforsøg

Til simulering af en usikker varmebehandling blev alle prøverne først opvarmet til 50°C i centrum med efterfølgende 10 minutters holdetid. I forforsøg blev det vist, at de anvendte *L. monocytogenes*-stammer overlevede denne varmebehandling (se figur 1) både i centrum og på overfladen.

I figur 1 ses, at podeniveauet er lidt under 10^6 cfu. Under opvarmning og holdetid er reduktionen ca. 0,5 log, både på overfladen og i centrum, og simulerer dermed en usikker varmebehandling. Opvarmning fra 6,4°C til 50°C i centrum tog 3 timer.



Figur 1. Overlevelse af *L. monocytogenes* efter 10 minutters varmebehandling ved 50°C.

Prøverne blev genopvarmet 3 gange over en periode på 3 uger. Mellem hver genopvarmning blev de opbevaret ved 5°C. Genopvarmningen var til 58°C i centrum med hhv. 1 og 180 min. holdetid. Efter genopvarmning blev prøverne lagt i isvand inden analyse. De resterende prøver blev nedkølet i sous vide-karret og efterfølgende lagt på køl ved 5°C.

Analyser

Analyse af prøver

Alle prøver fra både genopvarmnings- og lagringsforsøg blev analyseret for antal *C. botulinum* og *L. monocytogenes* på overfladen og i centrum af prøverne.

Overfladeprøver

Overfladen af kamstykket blev vasket i 50 ml FKP i prøvepose, og kødstykket blev efterfølgende fjernet. Hvis prøven indeholdt meget væske, blev FKP-mængde korrigeret for dette. Denne prøve (50 ml) svarede til 10⁰, som svarer til ca. 520 cm².

Tællletal blev ganget med fortynding = cfu/ml svarende til cfu/10 cm².

Centrumsprøver

De grønfarvede områder blev udskåret med steril skalpel fra geometrisk centrum.

Prøverne blev overført til stomacherposer og fortyndet med FKP i forholdet 1:9.

Prøvetyper

Sporecocktail (tripelbestemmelse) på hver podedag

Rå prøver (efter podning og henstand ved 5°C natten over)

Varmebehandlede prøver efter nedkøling

Lagrede prøver

Der blev udtaget 3-5 prøver pr. behandling, svarende til enkeltbestemmelse på flere gentagelser.

C. botulinum

Antal sporer i podematerialet blev bestemt ved, at fortyndingsrækken i rør a ca. 5 ml blev placeret i vandbad ved 75°C i 20 min. til inaktivering af vegetative celler. Fra disse prøver blev antal sporer bestemt på SFP-agar fra relevante fortyndinger.

Vegetative celler blev bestemt ved direkte udsæd på SFP-agar fra relevante fortyndinger, som ikke blev varmebehandlet.

Både analyse for sporer og vegetative celler af *Clostridium* blev analyseret på SFP-agar med 5% æggeblomme, men uden antibiotika, og inkuberet ved 30°C i 3 dage i anaerob beholder.

L. monocytogenes

Kimtal for *L. monocytogenes* blev bestemt på følgende måder:

Der blev udtaget en prøve fra stomacherpose til fortynding i FKP, derefter direkte udsæd på Oxford-agar (Oxoid CM0856) og inkubation ved 37°C i 2 døgn.

Data

Data fra både genopvarmning og lagring kan ses her:

[Y:\Projects\P2004287_SAF_26_WP2a_Semiforadlede produkter til food-service\Fagligt\Genopvarmning og lagring - patogenforsøg AGG\20170724 Data fra patogenforsøg maj 2017 genopvarmning og lagring \(version 1\).xlsb.xlsx](Y:\Projects\P2004287_SAF_26_WP2a_Semiforadlede_produkter_til_food-service\Fagligt\Genopvarmning_og_lagring_-_patogenforsøg_AGG\20170724_Data_fra_patogenforsøg_maj_2017_genopvarmning_og_lagring_(version_1).xlsb.xlsx)

Resultater – genopvarmning

Table 2. Opvarmnings-, holde- og nedkølingstider for genopvarmning.

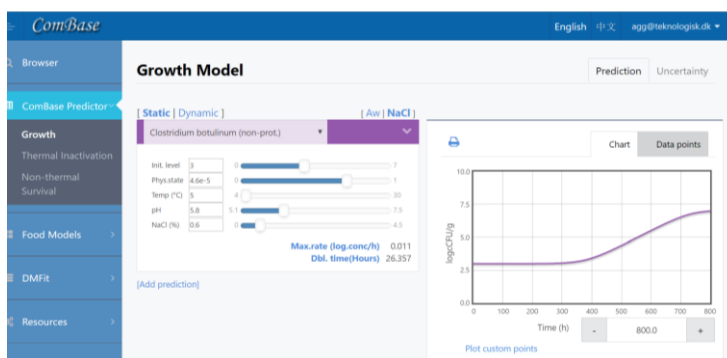
Proces	Tid til ønsket (T)	Temperatur (T)	Holdetid	Nedkølingstid til 5°C	Antal pakker
Usikker varmebehandling	209 min	50°C	10 min	219 min	35
1. genopv.	191 min	58°C	1 min 180 min	171 min	30
2. genopv.	181 min	58°C	1 min 180 min	141 min	20
3. genopv.	185 min	58°C	1 min 180 min	Ingen data ¹	10

¹Alle prøverne blev udtaget til analyse og blev nedkølet i isbad.

Opvarmningsprofilerne kan ses i bilag 2.

Inaktivering af patogener i centrum efter genopvarmning

I figur 3 ses, at antallet af *C. botulinum*-sporer, som forventet, er uændret efter varmebehandling til 50°C i centrum og 10 minutters holdetid. Efter 1 uges lagring ved 5°C efterfulgt af genopvarmning til 58°C med 1 min. eller 180 min. holdetid er antallet af sporer uændret. Ifølge Combase predictor har non-proteolytiske *C. botulinum* en nøle-fase på ca. 12 dage (pH 5,8 og 0,6% NaCl (se figur 2)). Det er i overensstemmelse med resultater for de anvendte stammer, hvor der blev konstateret bombage i svinekød efter 14 dages lagring ved 5°C (Jacobsen, 2005).

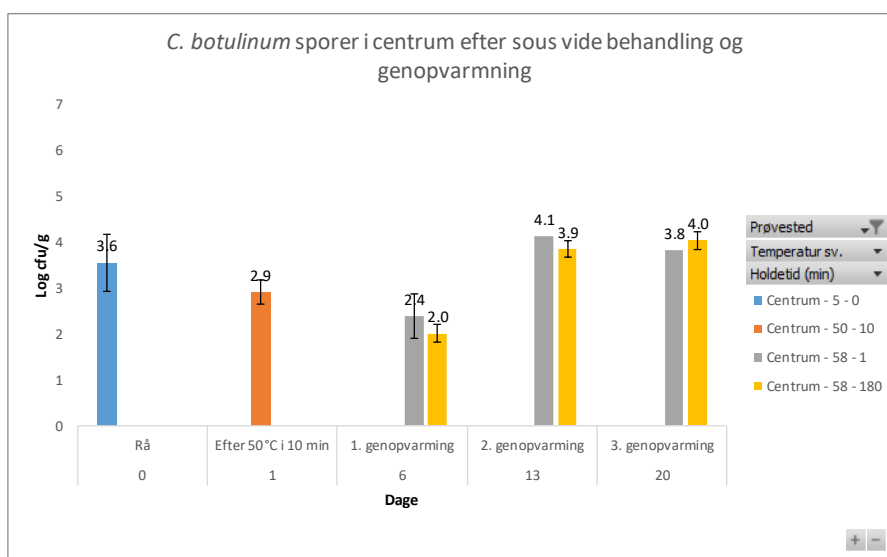


Figur 2. Prædiktion af nølefasen for non-proteolytisk *C. botulinum* ved 5°C, 0,6% NaCl og pH 5,8 (Combase predictor, accessed 20171204)

Efter yderligere en uges lagring ved 5°C og 2. genopvarmning til 58°C med hhv. 1 min. og 180 min.'s holdetid øges antallet af *C. botulinum*-sporer. Det indikerer, at der er øget risiko for vækst af *C. botulinum* og toxindannelse efter 2. genopvarmning. Efter 3. genopvarmning er niveauet det samme som efter 2. genopvarmning. Desuden ses det, at ikke er nogen effekt af at øge holdetiden fra 1 til 180 min.

Det øgede antal sporer skyldes sandsynligvis, at der efter 1. genopvarmning ikke er nogen nølefase. *C. botulinum* opformeres dels under lagring ved 5°C, dels under opvarmning. Ved opformering til høje niveauer af *C. botulinum* vil der dannes toxin. I sidste del af opvarmningen vil nogen celler sporulere, mens andre inaktiveres.

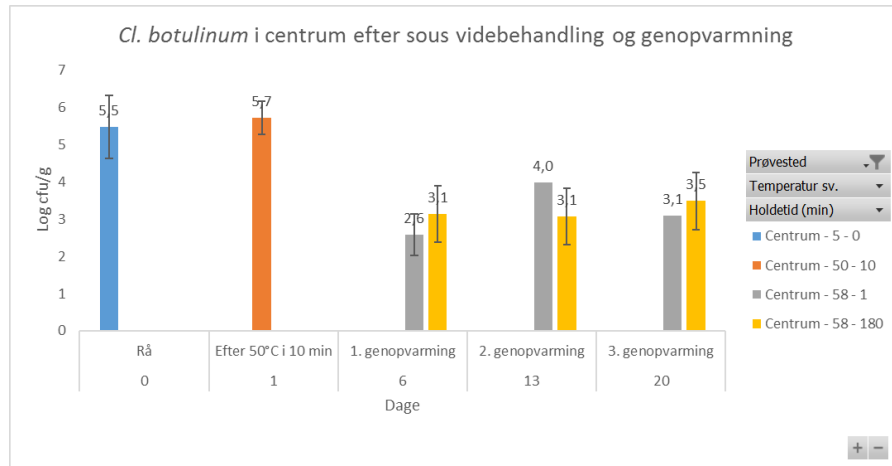
Det er i overensstemmelse med resultater rapporteret af Peck et al. (2006), som angiver, at ved opbevaring ≤5 dage ved 4-7°C findes der ikke toxin i 389 prøver, men hvis opbevaringstiden øges til 15 dage, øges antal toxinpositive prøver til hhv. 1% og 6%.



Figur 3. Antal *C. botulinum*-sporer i centrum af svinefilet efter podning, varmebehandling ved 50°C i 10 minutter og 3 genopvarmninger til 58°C i hhv. 1 og 180 minutter (n=5).

I figur 4 ses, at efter 1. genopvarmning er alle vegetative celler inaktiveret, da kimtallene er identiske for *C. botulinum* (figur 4) og sporer (figur 3).

Efter 2. og 3. genopvarmning er der ingen vegetative celler, da antallet er identisk med antal sporer (se figur 3). Men det skal pointeres, at der kan have været vækst under lagringen ved 5°C imellem genopvarmningerne.



Figur 4. Antal *C. botulinum* (både sporer og vegetative celler) i centrum af svinefilet efter podning, varmebehandling ved 50°C i 10 minutter og 3 genopvarmninger til 58°C i hhv. 1 og 180 minutter (n=5).

L. monocytogenes i centrum

Antal af *L. monocytogenes* reduceres med 1 log cfu/g efter varmebehandling ved 58°C i 10 minutter. Efter 1. genopvarmning er antallet af *L. monocytogenes* i centrum under detektionsgrænsen på 10 cfu/g og derfor ikke en risikofaktor ved genopvarmning (se bilag 6).

Delkonklusion:

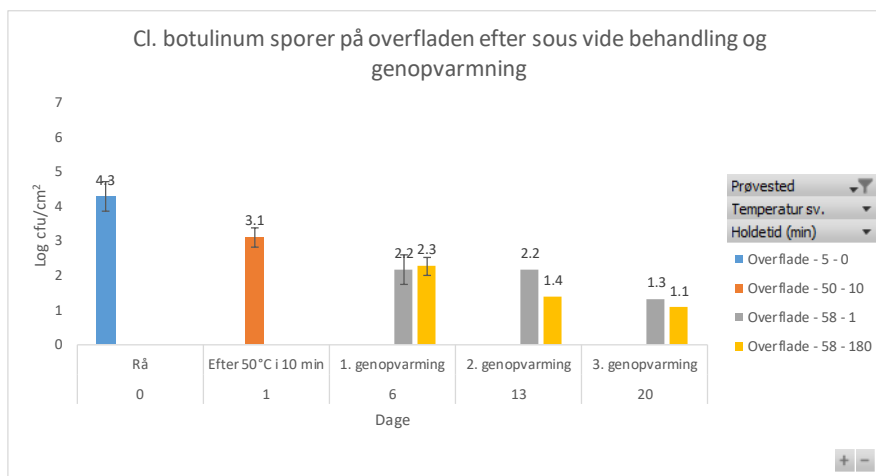
Efter 2. genopvarmning er der risiko for vækst af *C. botulinum* og efterfølgende sporulering og toxindannelse, da nølefasen elimineres. Det anbefales derfor kun at genopvarme sous vide-behandlede produkter 1. gang.

C. botulinum på overfladen

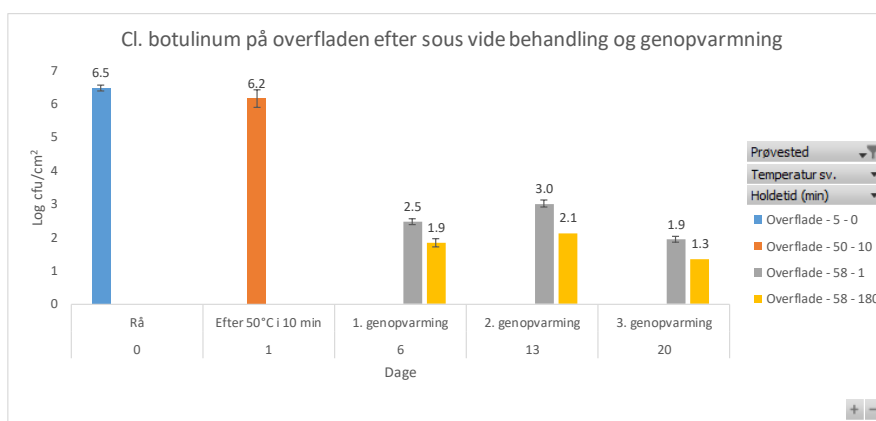
Inaktivering af patogener på overfladen efter genopvarmning

I figur 5 og 6 ses antal sporer og *C. botulinum* (sporer + vegetative celler) på overfladen af sous vide-behandlet kød, der er genopvarmet 3 gange. Overfladen af produktet er 58°C i ca. 360 min., da opvarmningstiden til 58°C i centrum tager 180 min. + holdetid på 180 min. Pga. den hurtige opvarmning til 58°C (momentan) forhindres vækst og sporulering, og de vegetative celler inaktiveres, svarende til at antallet af sporer er identisk eller faldende efter hver opvarmning. Men sporer i produktet vil ikke blive inaktiveret ved 58°C.

Det indikerer, at risikoen for toxindannelse er mindre på overfladen end i centrum ved genopvarmning og varmholdelse pga. en holdetid på 360 minutter (6 timer) ved 58°C på overfladen i forhold til langsom opvarmning til 58°C og 180 min. (3 timer) holdetid i centrum.



Figur 5. Antal *C. botulinum*-sporer på overfladen af svinefilet efter podning, varmebehandling ved 50°C i 10 minutter og 3 genopvarmninger til 58°C i hhv. 1 og 180 minutter (n=5)



Figur 6. Antal *C. botulinum* (sporer + vegetative celler) på overfladen af svinefilet efter podning, varmebehandling ved 50°C i 10 minutter og 3 genopvarmninger til 58°C i hhv. 1 og 180 minutter (n=5).

L. monocytogenes Antal af *L. monocytogenes* reduceres med 1 log cfu/g efter varmebehandling ved 50°C i 10 minutter. Efter 1. genopvarmning var antallet af *L. monocytogenes* på overfladen under detektionsgrænsen på 10 cfu/g.

L. monocytogenes med $D_{58^{\circ}\text{C}}$ -værdi på 3,9 min. (Jacobsen, 2011) inaktiveres på overflade og i centrum efter 1. genopvarmning til 58°C med efterfølgende holdetid på hhv. 1 min. og 180 min.

Konklusion – genopvarmning Ud fra disse resultater konkluderes:

- at sous vide-behandlet kød kun bør genopvarmes 1 gang pga. risiko for vækst af non-proteolytiske *C. botulinum* i kød, der har været opbevaret ved 5°C i mere end 7 dage inden genopvarmning.
- at varmholdelse ved 58°C i 3 timer ikke øger risikoen for vækst af *C. botulinum*.
- at *L. monocytogenes* ikke er en risikofaktor i forbindelse med genopvarmning, hvis anbefalinger til holdetid ved 58°C følges.

Resultater – lagringsforsøg

Tablet 3. Opvarmnings-, holde- og nedkølingstider for lagringsforsøg.

Proces	Tid til ønsket (T)	Temperatur (T)	Holdetid	Nedkølingstid til 5°C	Antal pakker
Lagring produktion 1	168 min	58°C	73 min	152 min	30
Lagring produktion 2	195 min	58°C	74 min	173 min	30
Lagring produktion 3	191 min	58°C	74 min	183 min	30

Tids- og temperaturprofilerne kan ses i bilag 4.

L. monocytogenes under lagring ved 2, 5 og 8°C

Rå svinefileter blev podet med 10^6 *L. monocytogenes*/cm² på overfladen og 10^5 *L. monocytogenes*/g i centrum. Efter varmebehandling ved 58°C i 73-74 min. var antallet under 100 *L. monocytogenes*/g eller cm² (detektionsgrænse), både på overflade og i centrum. Efter 12 dage og i resten af lagringsforløbet på 3 mdr. var antallet mindre end 10 *L. monocytogenes*/(g/cm²) (detektionsgrænse ved de øvrige udtag) (data kan ses i bilag 6).

Efter varmebehandling ved 58°C var der ingen overlevende *L. monocytogenes*, og listeria er ikke en risikofaktor ved genopvarmning og varmholdelse, da der ikke kan ske en krydskontamination, og produktet genopvarmes i den oprindelige emballage.

Psykrotrofe *C. botulinum* i centrum under lagring ved 2, 5 og 8°C

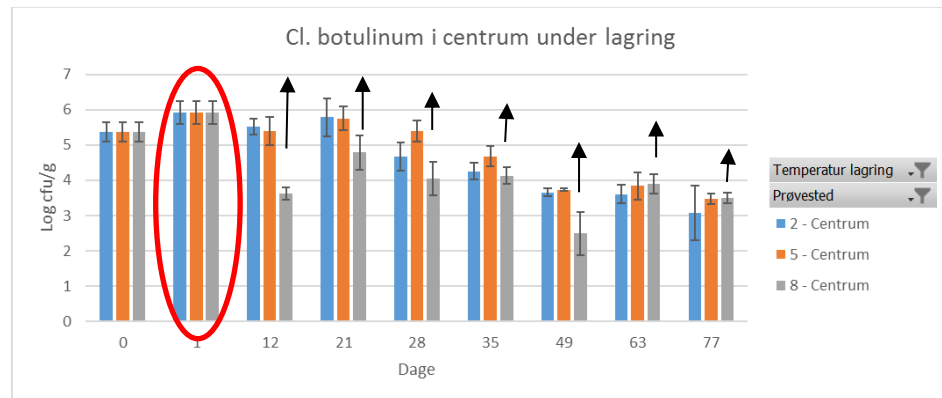
Under varmebehandling ved 58°C i 72 min. reduceres antallet af vegetative *C. botulinum* ikke som forventet. Efter varmebehandlingen var niveauet på samme niveau som før varmebehandlingen. Efter varmebehandlingen var det forventet, at antallet af vegetative *C. botulinum* blev reduceret til et niveau svarende til antal sporer. Tids- og temperaturforløbet for varmebehandlingen svarede til forløbet under genopvarmning (se bilag 1), hvor vegetative celler blev inaktiveret, så årsagen til den manglende reduktion er uvis. D-værdi for vegetative celler var få minutter ved 60°C (FAO), og de burde derfor være reduceret efter 72 min. ved 58°C. I figur 7 burde søjlerne markeret med rød cirkel have været på samme niveau (3 log cfu/g) som rød cirkel i figur 8.

Under lagring ved 8°C var der kraftig opformering af *C. botulinum* i hele lagringsperioden. Dette kan ikke ses i figur 7, da cellerne autolyserede, hvilket betyder, at de ikke var dyrkbare (sorte pile indikerer, at kimtallet er højere). I mikroskop er der set mange lange stave, hvilke indikerer, at der har været op til 10^{6-7} cfu/g. Dette stemmer også overens med, at der var kraftig bombage i pakker inkuberet ved 8°C fra ca. uge 4 (se billeder i bilag 5).

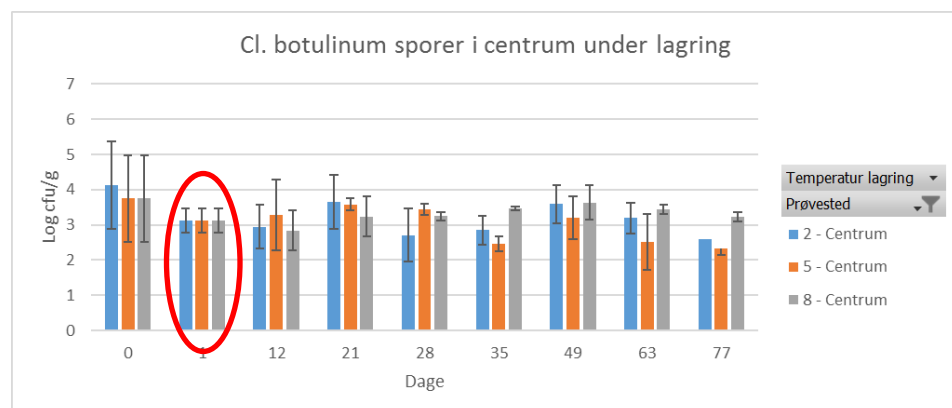
Ved 2 og 5°C var der ingen eller minimal opformering, men det antages, at kimtallene for prøver lagret ved 5°C har været højere. Det

skyldes, at clostridier ikke kan tælles, da cellerne inaktiveres pga. egne metabolitter (=autolysere). Det er set i tidligere forsøg beskrevet af Jacobsen (2005).

Antallet af sporer er konstant ved alle 3 lagringstemperaturer i hele lagringsperioden (se figur 8).



Figur 7. Antal *C. botulinum* (sporer + vegetative celler) i centrum af svinefilet efter podning, varmebehandling ved 58°C i 72 minutter og efterfølgende lagring ved hhv. 2, 5 og 8°C.



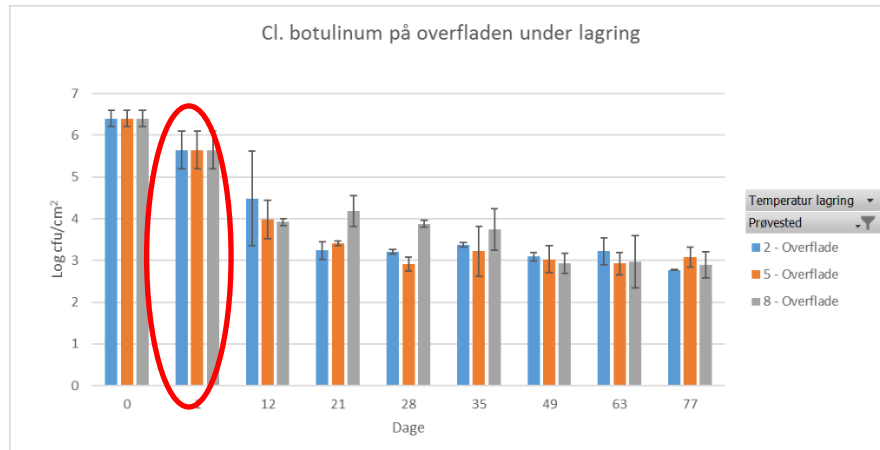
Figur 8. Antal *C. botulinum*-sporer i centrum af svinefilet efter podning, varmebehandling ved 58°C i 72 minutter og efterfølgende lagring ved hhv. 2, 5 og 8°C.

Psykrotrofe C. botulinum på overfladen under lagring ved 2, 5 og 8°C

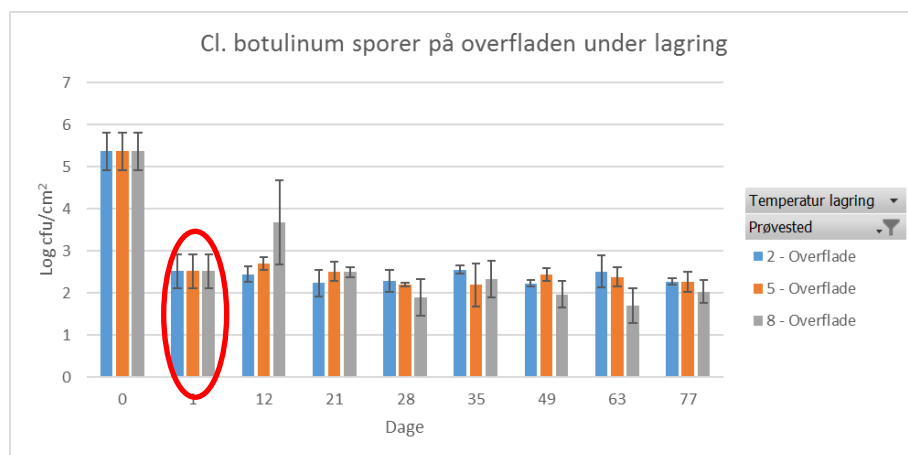
Ligesom i centrum skete der ingen reduktion af de vegetative celler på overfladen efter varmebehandling ved 58°C i 72 min.

I figur 9 ses, at antallet af vegetative celler og sporer er stort set ens under hele lagringsforløbet, dog er forskellen størst i starten af lagringsforløbet. Under lagring øges autolysering af cellerne pga. dannelse af metabolitter med lyserende effekt, hvilket betyder, at der kun tælles en mindre del af de vegetative celler. Det antages, at kimtallene ved 5 og 8°C har været højere pga. autolyse af cellerne.

I figur 10 ses, at antallet af sporer er uændret ved 2, 5 og 8°C, da antallet af sporer og vegetative celler + sporer stort set er identiske fra dag 21. Inaktivering af de vegetative celler skyldes, at holdetiden ved 58°C reelt har været ca. fire gange så lang på overfladen.



Figur 9. Antal *C. botulinum* (sporer + vegetative celler) på overfladen af svinefilet efter podning, varmebehandling ved 58°C i 72 minutter og efterfølgende lagring ved hhv. 2, 5 og 8°C.



Figur 10. Antal *C. botulinum*-sporer på overfladen af svinefilet efter podning, varmebehandling ved 58°C i 72 minutter og efterfølgende lagring ved hhv. 2, 5 og 8°C.

Konklusion lagring

Lagring ved 8°C resulterer i kraftig vækst af *C. botulinum* i centrum, da prøverne er bomberet og indeholder lange stave. Lagring ved 8°C kan ikke anbefales og må maksimalt være på 4 dage, svarende til nølefasen ved 8°C (se figur 2).

Pga. den manglende inaktivering af vegetative celler efter varmebehandling og evt. autolysering er det ikke muligt at vurdere, om der er sket en opformering af *C. botulinum* ved lagring ved 5°C i centrum. Det anbefales at følge eksisterende anbefalinger fra FSA, som angiver max. 10 dages lagring ved 5°C.

Det antages, at der ikke har været vækst ved 2°C, da det er under minimumstemperaturen for vækst af non-proteolytiske *C. botulinum*. Ifølge Baldwin (2011) kan produkter lagres i op til 90 dage ved 2°C i forhold til risiko for toxindannelse af non-proteolytiske *C. botulinum*.

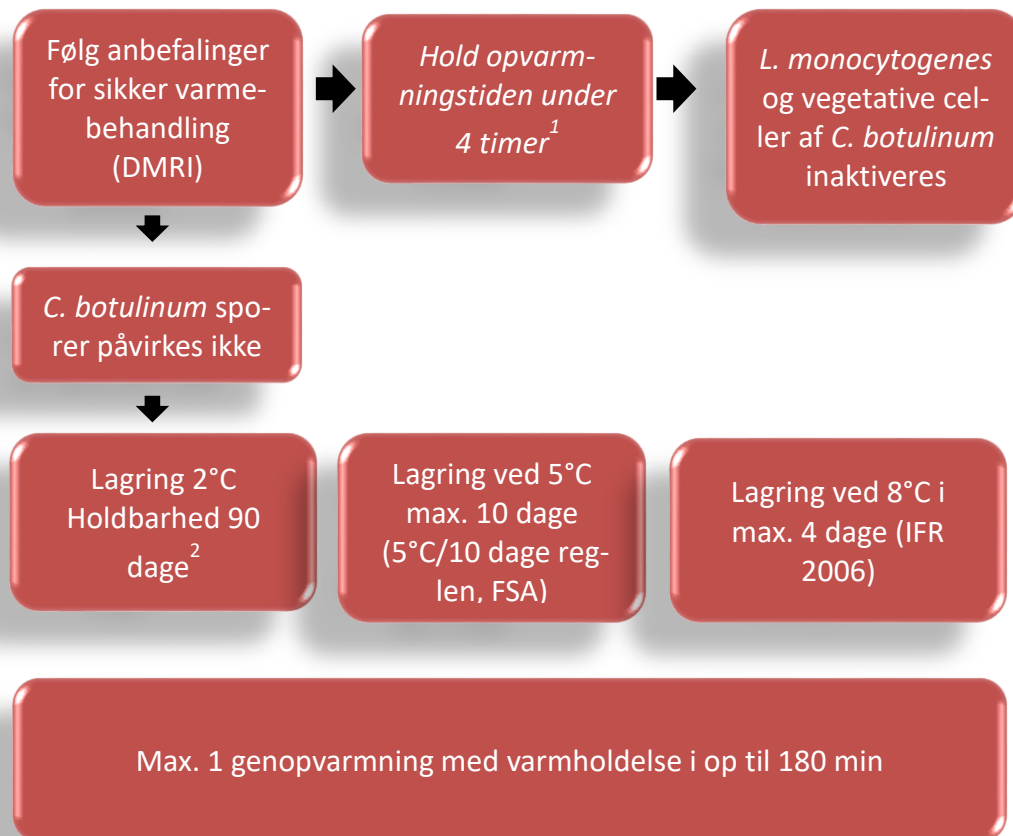
Konklusion

- *C. botulinum* kan opformeres under kølelagring (5°C i mere end 5 dage) og under langsom opvarmning i sous vide-behandlet svinefilet, som har været genopvarmet én gang.
- *C. botulinum* opformeres ikke under varmholdelse ved 58°C i 3 timer
- Lagring ved 8°C giver kraftig bombage, hvilket indikerer kraftig vækst.
- Pga. forsøgstekniske problemer kan der ikke angives holdbarhedstider for opbevaring ved 2 og 5°C, men det anbefales at følge FSA's vejledninger
- *L. monocytogenes* er ingen risikofaktor i forbindelse med genopvarmning til 58°C efter en varmebehandling ved 58°C i 72 min.
- *L. monocytogenes* inaktiveres ikke ved varmebehandling ved 50°C i 10 min.

Anbefalinger

Ud fra disse resultater anbefales følgende for genopvarmning og lagring af sous vide-behandlet kød:

- Max. 1 genopvarmning efter lagring ved 5°C i max. 10 dage
- Max. 4 dages holdbarhed ved lagring ved 8°C
- Max. 10 dages holdbarhed ved lagring ved 5°C
- Max. 90 dages holdbarhed ved lagring ved 2°C



¹) Anbefalinger fra NSW Food Authority, New Zealand. Sous Vide Food Safety precautions for restaurants (NSW/FA/CP058/1207). For at undgå vækst af *C. perfringens*.

²) Holdbarhed relateret til fødevarerikkerhed.

Oversigt over inaktivering af patogener efter varmebehandling ved forskellige temperaturer og holdetider (DMRI's anbefalinger)

Tid og temperatur	Li- ste- ria	C. bot. (non prot)	C. perf ⁴ (veg)	Ent. fae- cium	Sal- mo- nella ²	E. coli ³	HE- vi- rus ⁵	HAV	Noro- virus
75°C	+	+/ [÷] ¹	+	+	+	+	÷	?	?
70°C 1 min	+	+/ [÷] ¹	+	÷	+	+	÷	?	?
65°C 6 min	+	+/ [÷] ¹	+	÷	+	+	÷	?	?
63°C 12 min	+	+/ [÷] ¹	+	÷	+	+	?	?	?
60°C 35 min	+	+/ [÷] ¹	+	÷	+	+	÷	÷	÷
58°C 72 min	+	+/ [÷] ¹	+	÷	+	+	?	?	?

¹ vegetative/sporer

² $D_{70^{\circ}\text{C}}=0,14$ (Asselte et al., 2006)

³ $D_{60^{\circ}\text{C}}=3,22$ (Ahmed et al., 1995)

⁴ $D_{70^{\circ}\text{C}}=0,38$ (Asselte et al., 2006)

⁵ $D_{70^{\circ}\text{C}}=\text{HEV}$ overlever, men reduceres i antal FFU (Anonym, 2017)

Referencer

Ahmed, N. M., Conner, D.E., Huffman, D. L. (1995). Heat-Resistance of Escherichia coli O157:H7 in Meat and Poultry as affected by Product Composition. J. of Food Science vol. 60, no. 3.

Anonym (2008). Food Standards Agency guidance on the safety and shelf-life of vacuum and modified atmosphere packed chilled foods with respect to non-proteolytic Clostridium botulinum. July 2008

Anonym (2017). Public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen. EFSA journal 2017; 15(7):4886. www.efsa.europa.eu/efsajournal

Asselte, E. D. and M. H. Zwietering (2006). A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. Int. J. of Food Microbiology. 107, 73-82

Baldwin, D. E. (2011). Sous vide cooking: A review. Int. J. of Gastronomy and Food Science 1 (2012) 15-30

Fernandez, P. og M. Peck (1999). A predictive model that describes the effect of prolonged heating 70 to 90°C and subsequent incubation at refrigeration temperatures on growth from spores and toxigenesis by nonproteolytic *Clostridium botulinum* in the presence of lysozyme. *App. and Env. Microbiology* 65 (8), 3449-3457.

Gunvig, A. (2011). Sikkerhedsvurdering af sous vide-behandling ved 53°C. Projekt nr. 1379348-17 version 5. DMRI, Teknologisk Institut

Jacobsen, T. (2005). Udvælgelse af sporedannende bakterier til produktforsøg. SF dok. Nr. 27552

Jacobsen, T. (2011). D-værdi bestemmelse af listeria og *Streptococcus thermophilus*. Rapport, proj. Nr. 2000532-01, DMRI, Teknologisk Institut.

Peck, M. et al (1992). The effect of recovery medium on the estimated heat inactivation of spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum*. *Letters in Applied Microbiology*, 15, 146-51.

Peck, M. (1997). *Clostridium botulinum* and the safety of refrigerated processed foods of extended durability. *Trends in Food Science & Technology* 8, 186-192.

Peck, M., K. Goodburn, R. Betts, S. Stringer (2006). *Clostridium botulinum* in vacuum packed and modified atmosphere packed chilled foods. Final project report (B13006) July 2006. Institute of Food Research (IFR).

Opformering af *C. botulinum*-sporer

Sporeopformering Clostridiumstammerne vækkes fra frost ved at pøde et fryserør (1 ml) til 10 ml Tryptone Pepton Glucose Yeast extract (TPGY) 30°C i 3 dage i anaerob beholder/bænk.

Derefter podes 2 ml/stamme videre til Cooked Meat Medium (CMM), 2-fase substrat (dobbelst størrelse med 20 ml vand). Kulturerne inkuberes igen ved 30°C i anaerob beholder i **12 (13) dage**. Væskefasen af substratet centrifugeres ned i afkølet centrifuge ved 5.000 rpm i 15 min. ved 4°C. Supernatanten hældes ud, og pellet resuspenderes i 20 ml steril, iskold FK.

Herefter centrifugeres sporerne atter ned på samme måde. Supernatanten hældes fra, og pellet resuspenderes i 10 ml steril, iskold FK. Sporerne anvendes samme dag.

TPGY

TPGY (pr. 1000 ml)

Tryptone	50 g
Peptone	5 g
Glycose	4 g
Yeast extract	20 g
Natrium thioglycollate	1 g
Distilled water	1 litre

pH 7,0 ± 0,2, autoklaveres ved 121°C i 10 min.

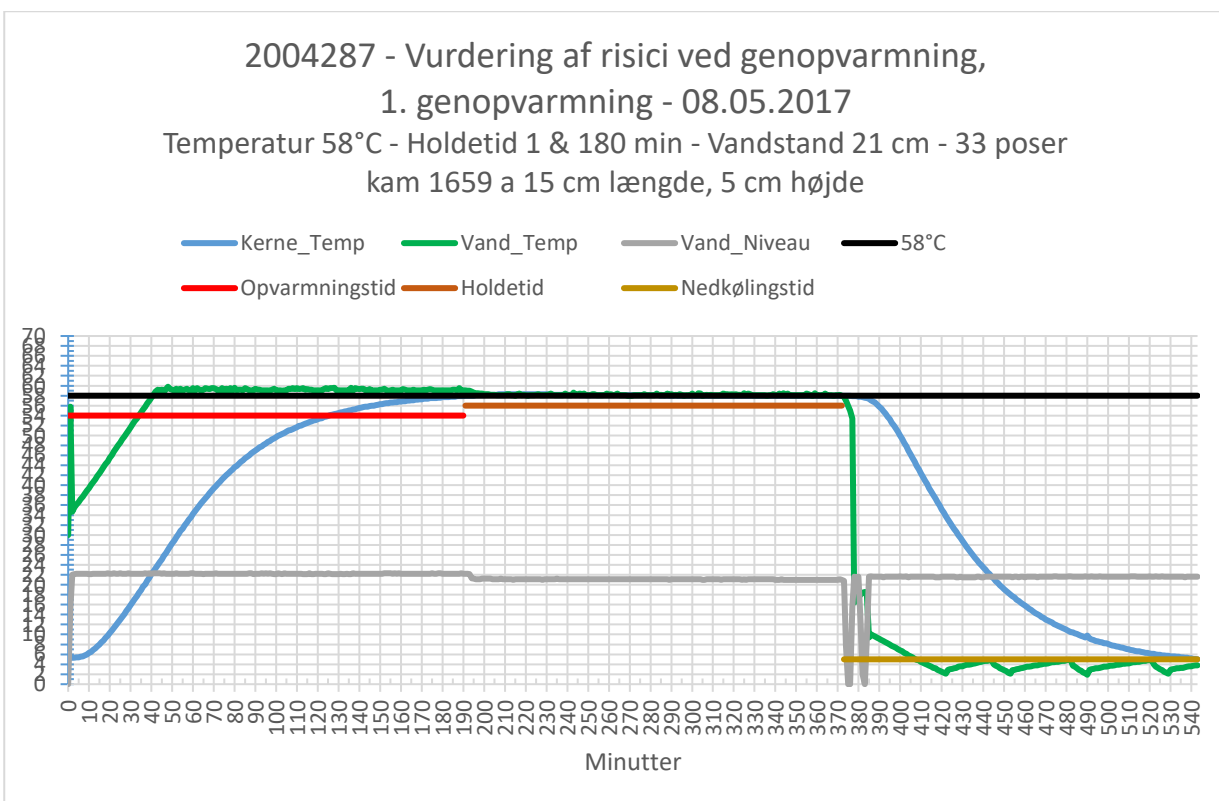
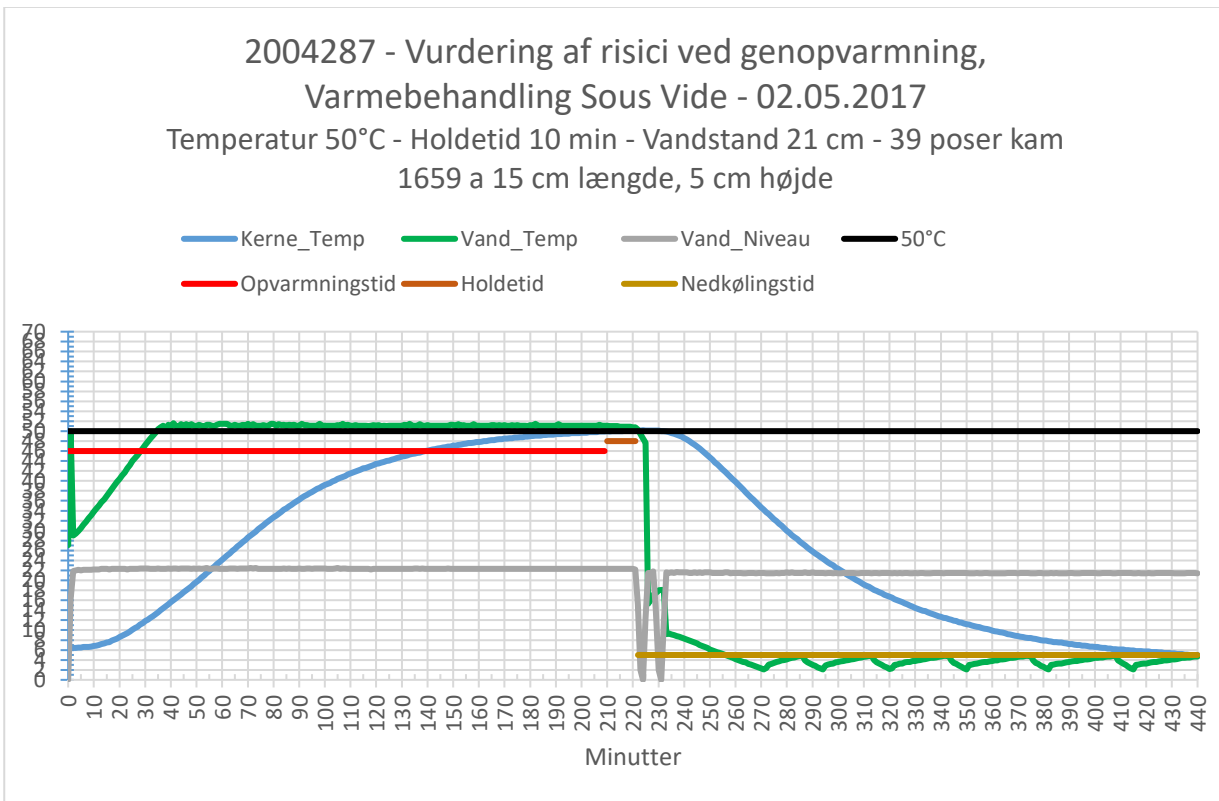
CMM

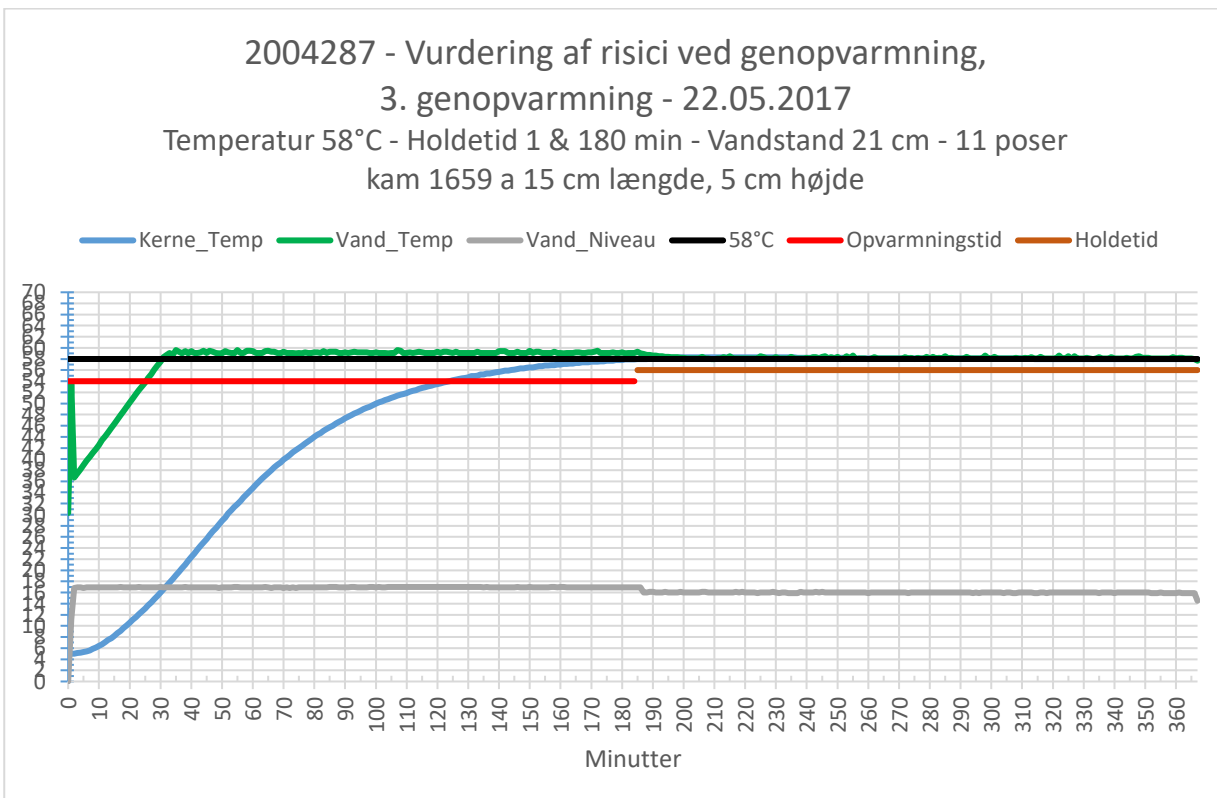
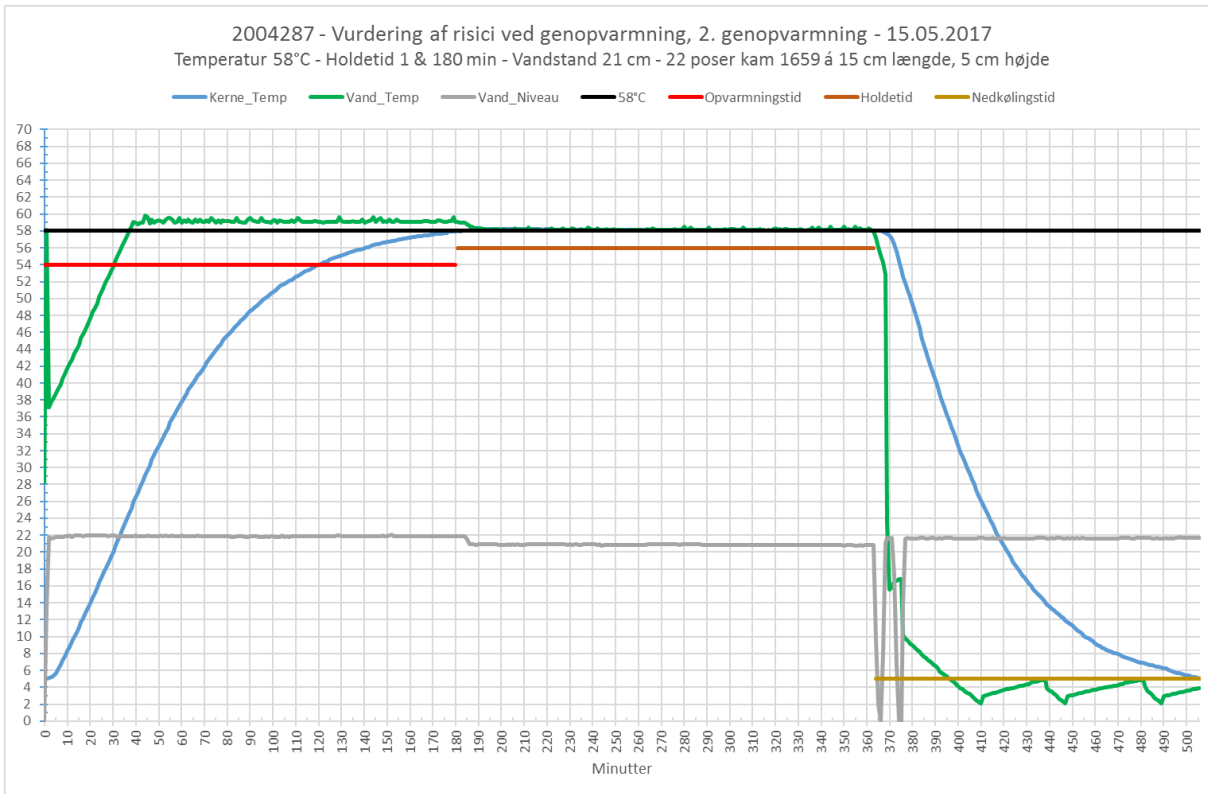
Dobbelt CMM 2-fase system (pr. 75 ml) (Peck et al., 1992)

30 g kødpiller, 2,26 g agar og 0,16 g glukose oplødes i 150 ml vand i en 500 ml Blue Cap-flaske og henstår 20-30 min. ved stuetemperatur. Autoklaveres 10 min. ved 121°C. Let omrystning efter autoklavering.

Umiddelbart inden podning dækkes den stivnede agar med 20 ml sterilt vand (vandet strømmes i 10 min./flaske m. 100 ml umiddelbart inden brug).

Opvarmningsprofiler



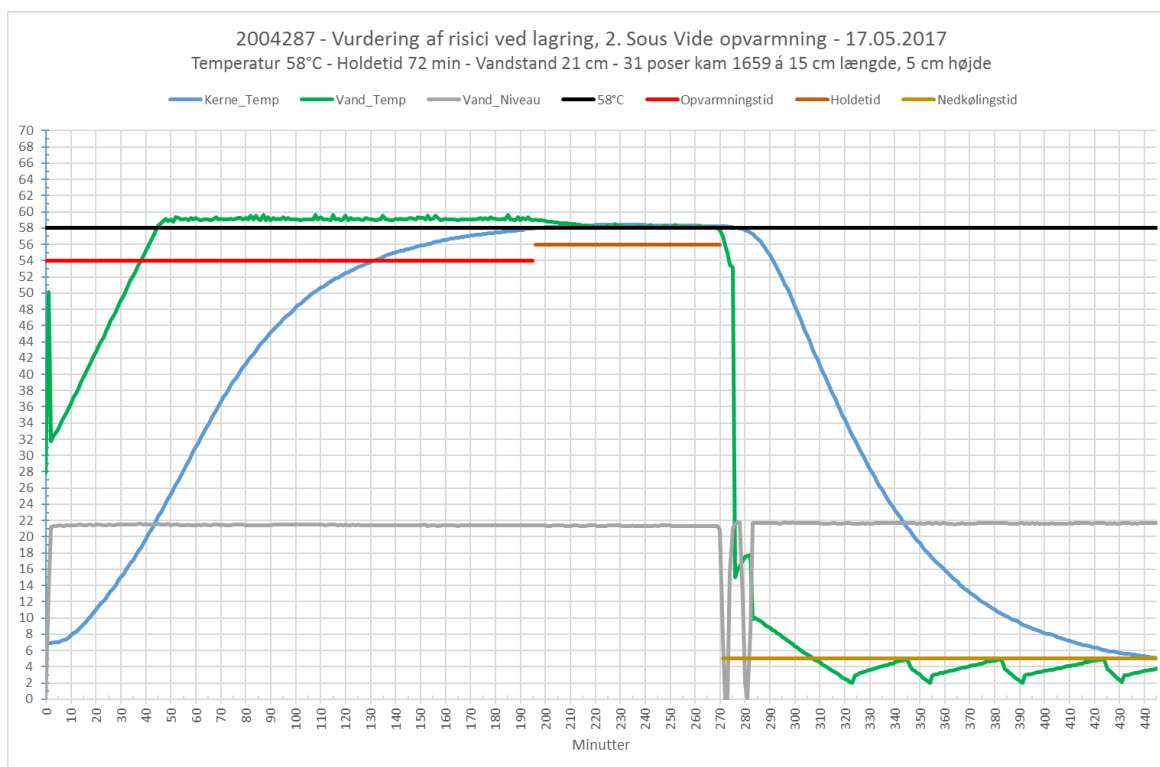
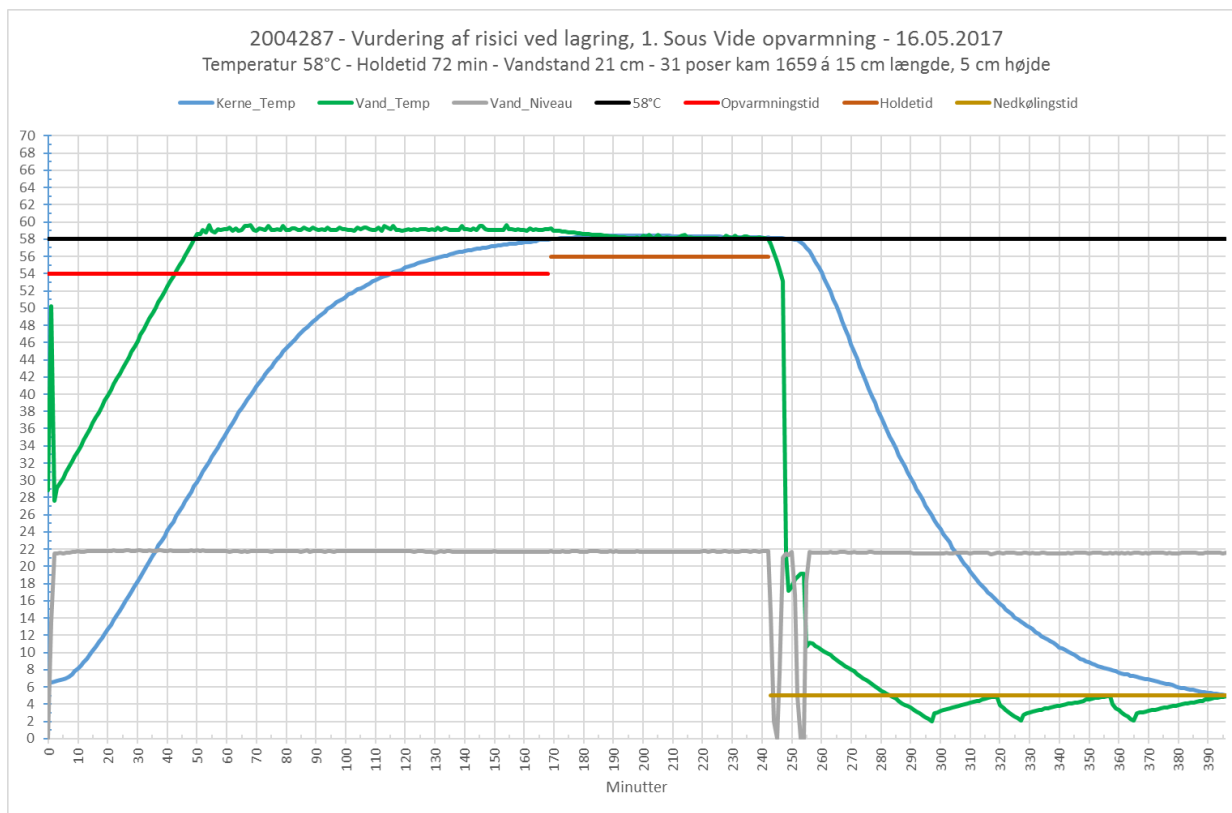


Bilag 3

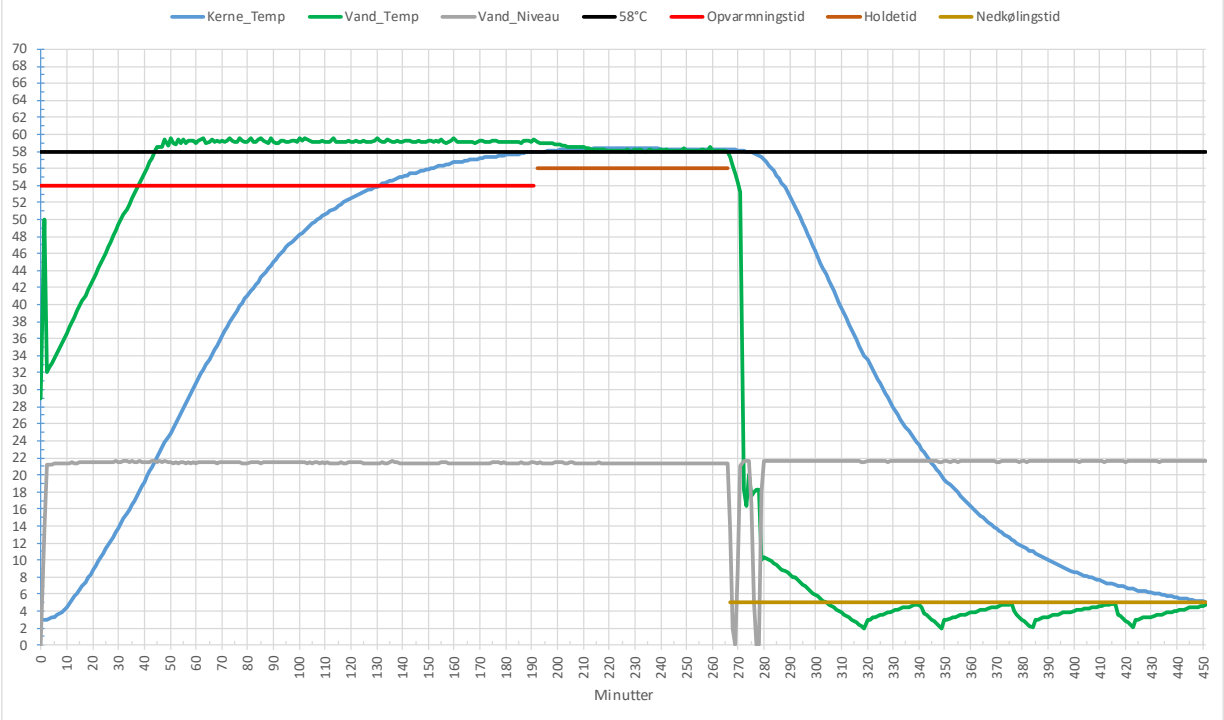
Datablad for Cryovac-posser kan ses her:

[2015 - CN300 ProdSheets EU EN \(002\).pdf](#)












Tids- og temperaturprofiler for prøver til lagringsforsøg



2004287 - Vurdering af risici ved lagring, 3. Sous Vide opvarmning - 18.05.2017
Temperatur 58°C - Holdetid 72 min - Vandstand 21 cm - 31 poser kam 1659 á 15 cm længde, 5 cm højde



Billeder af prøver lagret ved hhv. 2, 5 og 8°C.

Uge	2°C	5°C	8°C
4			
5 (35 dage)			
7			
			
9			
11	