



Slutrapport

Undgå toksin fra skimmelvækst ved brug af mælkesyrebakterier Sammendrag af resultater og perspektivering af brug af mælkesyre- rebakterier til at hindre skimmelvækst og toksinproduktion

Anette Granly Koch og Tomas Jacobsen

31. december 2021

Proj.nr. 2008773

Version 1

Init. AGLK/MT/TJAN

Formål

Indledning

Denne rapport samler konklusionerne fra de SAF-projekter, der er gennemført om skimmel i perioden 2004-2021.

Det drejer sig om følgende projekter:

2020-2021

Titel: Undgå toksin fra skimmelvækst ved brug af mælkesyrebakterier

Projektnummer: 2008773

Formål: at skabe viden og dokumentation, så produktion af skimmeltoksiner kan hindres i kødprodukter. Målet er at finde mælkesyrebakterier, som kan anvendes til at hindre toksindannelse fra skimmelvækst på kødprodukter.

2004-2008

Titel: Skimmel i kødprodukter

Projektnummer: 18505 og 18553

Formål: at identificere, hvilke skimler der findes i produktionsmiljøet på kødforædlingsvirksomheder samt vise, hvordan vækst og toksinproduktion kan hindres under produktion af leverpostej, spegepølse og tørret skinke.

Indholdsfortegnelse

Brug af mælkesyrebakterier til at hindre vækst og toksindannelse fra skimmel (2020-2021)	3
Mælkesyrebakteriers antifungale effekt (litteraturstudium)	3
Screening for mælkesyrebakterier med antifungal effekt	4
Effekt af fermentater i leverpostej.....	6
Effekt af mælkesyrebakterier i leverpostej.....	10
Effekt af mælkesyrebakterier i spegepølser (minispegepølser)	11
Sensorisk bedømmelse af spegepølser produceret med antifungale kulturer	13
Antifungal effekt i spegepølser	14
Skimmel i kødprodukter (2004-2008).....	15
Vækst under 2-3 ugers produktion af spegepølse.....	17
Vækst under lagring af spegepølser og leverpostej.....	18
Æteriske olier og flydende røg til hæmning af skimmel	20
Vækst og toksinproduktion på tørrede skinker	21
Rengøring og desinfektion	21
Anbefalinger/Perspektivering	22
Korte overordnede konklusioner	25
Opfølgning	25
Referencer	27

Brug af mælkesyrebakterier til at hindre vækst og toksindannelse fra skimmel (2020-2021)

Baggrund

Skimmel er generelt uønsket i fødevarer, idet skimmel kan danne toksiner og dermed udgøre en sundhedsfare. Derfor er der opstillet grænseværdier for indhold af specifikke skimmeltoksiner i nogle produkter. I det tidligere SAF-projekt "Risiko for toksindannelse fra skimmel i kødprodukter" (2005-2006) blev det vist, at skimlernes *Penicillium nordicum* og *Penicillium brevicompactum* dannede sekundære metabolitter henholdsvis ochratoksin og mycophenolsyre, når de voksede på fx spegeskinke eller leverpostej. Derimod blev de sekundære metabolitter ikke dannet, når skimlernes voksede på fermenterede spegepølser.

Nyere forskning har vist, at skimlen *Aspergillus flavus* ikke danner aflatoxin, når den vokser sammen med mælkesyrebakterien *Lactobacillus plantarum*, fordi denne bakterie udskiller små mængder af phenylmælkesyre, som hæmmer svampens udskillelse af toksin (Guimaraes et al., 2018a). Det er ligeledes blevet vist, at cellefrie fermentater fra mælkesyrebakterier kan hæmme udskillelsen af ochratoksin fra *Penicillium nordicum* (Guimaraes et al., 2018b). Dette er interessant i forhold til en forebyggende tilgang, hvor mælkesyrebakterier potentielt kan anvendes til bio-konservering af forskellige produkter. Potentialet for at anvende bakterien eller dens metabolitter i et fermentat synes meget stort i forhold til konservering af en lang række produkter herunder skinker og modnede kødudskæringer. Dette fordrer naturligvis, at mælkesyrebakterierne eller fermentatet ikke ændrer på produktkvaliteten, hvor særligt smagen kan blive udfordret

Aktiviteter

Projektets aktiviteter har omhandlet:

- Litteraturstudium om mælkesyrebakteriers hæmning af skimmel
- Screening af mælkesyrebakteriers antifungale effekt i agar assay
- Test af fermentaters antifungale effekt i leverpostej
- Test af mælkesyrebakteriers antifungale effekt i leverpostej
- Test af fermentaters antifungale effekt i kogt spegepølsemodel
- Test af mælkesyrebakteriers antifungale effekt i minispegepølser
- Test af mælkesyrebakteriers antifungale effekt i pilot plant spegepølser
- Sensorisk bedømmelse af spegepølser produceret med antifungale mælkesyrebakterier

Mælkesyrebakteriers antifungale effekt (litteraturstudium)

Litteraturstudiet viste, at en række undersøgelser har vist, at mælkesyrebakterier, herunder særligt *Lactobacillus*, kan hindre skimmelvækst eller dannelsen af toksiner. Flere *in vitro*-studier har udpeget mælkesyrebakterien *Lb. plantarum* som værende en lovende kandidat til at hæmme skimmelvækst og toksindannelse, da en bredspektret aktivitet mod flere relevante skimmelsvampe er blevet dokumentet. Derudover har *Lb. buchneri*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. casei*, *Lb. brevis*, *L. coryniformis*, *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri* samt *Pediococcus pentosaceus* og *Enterococcus faecium* vist lovende resultater. De antimikrobielle egenskaber mod skimmelsvampe har vist sig at være stammespecifikke, og det er derfor ikke alle stammer inden for en art, der kan hindre skimmelvækst og toksindannelse. Mælkesyrebakterierne evne til at hæmme skimmelvækst kan kædes sammen med udskillelsen af antimikrobielle

komponenter, fx dipeptider eller proteinderivater, samt derivater af de organiske syrer, som bakterierne producerer fx phenylmælkesyre. Tilsætning af phenylmælkesyre til vækstmediet har vist sig at påvirke både skimmelvækst og sporedannelse. Et studie fra 2020 har undersøgt den svampehæmmende effekt af 'quorum sensing' molekylet 2-phenylethanol og påvist, at tilsætning nedsætter vækst og sporespiring af den toksinproducerende skimmelsvamp *Penicillium nordicum* (Pedersen, 2020).

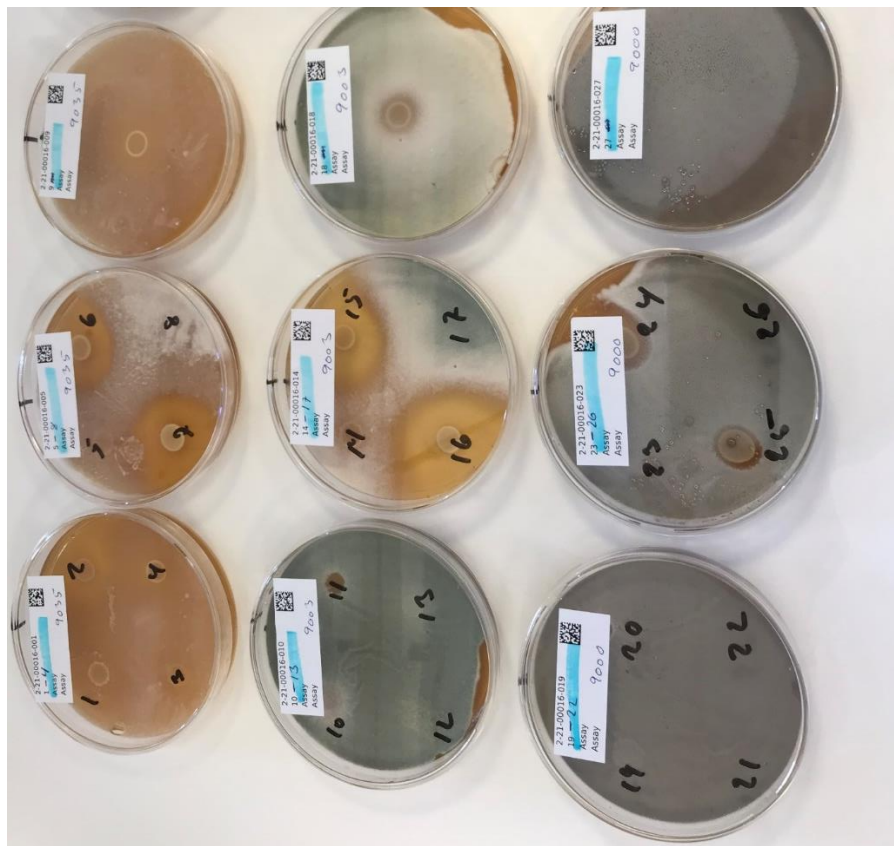
Metode

Screening for mælkesyrebakterier med antifungal effekt

Screeningen blev gennemført ved agar spot assay, hvor 5 µl af -1 fortyndingen af mælkesyrebakterier eller kommercielle kulturer blev placeret på BHI- og MRS-agar (4 spot pr. plade). Dråberne tørrede, inden pladerne blev vendt og inkuberet anaerobt hhv. aerobt ved 20°C til kraftig vækst.

En soft agar blev podet med ca. 10⁴ skimmelsporer pr. ml. Soft agaren blev hældt over pladerne med vækst af mælkesyrebakterier. Følgende skimler blev anvendt:
P. nordicum DMRICC 9035 (ochratoksin)
P. brevicompactum DMRICC 9003 (mycophenolsyre)
P. salamii DMRICC 9000

Pladerne blev inkuberet aerobt ved 20°C i 3-5 dage for analyse af hæmzoner omkring spot af mælkesyrebakterier.



Figur 1. Et eksempel på hæmning/ingen hæmning af skimlernes vækst.

Resultater

Kolonne til venstre *P. nordicum*, kolonne i midten *P. brevicompactum* og kolonne til højre *P. salamii*. Spot 6, 15 og 24 er kultur LP37. Spot 7, 16 og 25 er kultur SG48.

Der blev screenet mælkesyrebakterier fra DMRICC, Chr. Hansen, Danisco og Sacco. Mælkesyrebakterier beskrevet i litteraturen blev forsøgt hjemtaget, men desværre uden held.

- *DMRICC* 25 stammer fra DMRICC blev udvalgt til screeningen. Blandt de afprøvede mælkesyrebakterier var det hovedsagelig *Lb. sakei*, som kunne begrænse skimmelvæksten. Når mælkesyrebakterierne havde vokset på MRS-agar gav det meget kraftigere hæmning af skimmel, end når de blev dyrket på BHI-agar. Anaerob inkubering af mælkesyrebakterierne gav lidt bedre hæmning af skimmel end aerob inkubering (Jacobsen, 2020a).

Af de 25 afprøvede mælkesyrebakterier fra DMRICC var der 7 bakteriestammer, som gav nogen inhibering af en eller flere af skimlernes. De mest lovende var:

Lb. sakei DMRICC 0045

Lb. spp. DMRICC 2223

Lb. collonoides DMRICC 4301

Lb. sakei DMRICC 5025

Lb. sakei DMRICC 5026

Lb. sakei DMRICC 5031

Lb. sakei DMRICC 5032

- *Chr. Hansen* Fra Chr. Hansen blev 8 starterkulturer testet. Ingen af starterkulturerne kunne hæmme *P. brevicompactum* eller *P. salamii*, så der blev en klar zone fra randen af spot og til vækst af skimmel.

I forhold til *P. nordicum* var der enkelte af kulturerne, der gav klaringszoner på mellem 1 og 4 mm fra spotkanten og til begyndelsen på skimmelvæksten.

Grundet den svage væksthæmmende effekt blev ingen af kulturerne valgt til det videre forsøgsarbejde i produkter (Jacobsen, 2020b).

- *Danisco* Fra Danisco blev 4 starterkulturer udvalgt til screening af væksthæmmende effekt overfor skimmel.

Blandingskulturen HOLDBAC YM-XPB LYO 500 DCU (sælges med effekt mod gær/skimmel i mejeriprodukter) kunne hæmme væksten af alle tre skimler. Denne kultur var væsentlig bedre end de tre andre starterkulturer fra Danisco, som kun hæmmede *P. nordicum* og *P. brevicompactum*, men ikke med *P. salami*. (Jacobsen, 2021a).

- *Sacco* Fra Sacco blev 19 forskellige kulturer testet. Følgende kunne, efter anaerob dyrkning) hæmme både *P. nordicum* og *P. brevicompactum*:

LHR-14 (*L. rhamnosus*)

CLP C (*C. piscicola* + *L. plantarum*)

LP-01 (*Lactiplantibacillus plantarum*)

LP37 (*L. plantarum*)

SG48 (blandingskultur med *L. plantarum*, *Meat cracks*)

LSK18 (*Lactilactobacillus sakei*)

Ved aerob dyrkning af mælkesyre kulturerne kunne følgende kulturer også hæmme *P. nordicum* og *P. brevicompactum*:

LP-01 (*Lactiplantibacillus plantarum*)

LP37 (*L. plantarum*)

SG48 (blandingskultur med *L. plantarum*; *Meat cracks*)

LPRA (*L. plantarum* + *L. rhamnosus*)

Det betyder, at de fleste af de kulturer, som kunne hæmme skimlerne, tilhører arten *L. plantarum*. Dette er helt i overensstemmelse med litteraturstudiet, hvor der også er beskrevet mange *L. plantarum*-stammer med egenskaber til at hæmme væksten af forskellige skimler (Koch og Jacobsen, 2021).

Konklusion

Samtlige screeningsresultater blev sammenholdt, og de stammer, som havde størst væksthæmmende effekt (hæmzoner > 10 mm fra kant bakteriespot til skimmelvækst) overfor alle tre skimler eller som minimum *P. nordicum* og *P. brevicompactum*, blev udtaget til test i kødprodukter. Desuden skulle kulturerne producere hæmstofferne ved både aerob og anaerob dyrkning. De udvalgte stammer var: Lb. sp. DMRICC 2223, Lb. sakei DMRICC 5032, Lb. sakei DMRICC 0045, Lb. collonoides DMRICC 4301, Lb. sp. DMRICC 2223 fra vores kultursamling og starterkulturerne Holdbac YM-XPK, Bitec LS-25, Chr. Hansen Bactoflavor Flora Italia, BioPrime SG48 og Sacco LP 37. Sidstnævnte blev ved en fejl ikke testet i minispegepølser.

Metode

Effekt af fermentater i leverpostej

Følgende blev undersøgt for antifungal effekt under lagring af leverpostej ved 5°C:

- fermentater fra mælkesyrebakterier som tilsætning til rå leverpostejfars inden bagning

De anvendte skimler var:

- *P. nordicum* DMRICC 9035 (ochratoksin)
- *P. brevicompactum* DMRICC 9003 (mycophenolsyre)

De anvendte mælkesyrebakterier var:

- *Lb. sakei* DMRICC 5032
- HOLDBAC YM-XPK LYO 500 DCU
- Sacco L.s.R. LP 37 (*Lb. plantarum*)

Fermentatet blev fremstillet ved at pøde med 1% kultursuspension/bouillon dvs. 0,1 ml til 10 ml alm. MRS-B. Flaskerne blev inkuberet ved 30°C i 3 dage til kraftig vækst. Efter centrifugering blev den rå leverpostejfars tilsat hhv. 5% og 10% fermentat. Postejerne blev bagt til 85°C i centrum (bagetid ca. 20 minutter).

Efter afkøling blev postejerne punktinkuleret med skimmelsuspensionerne og lagret ved 5°C i 20 dage (aerobt i plastposer). Skimmeldiameteren blev målt, og udvalgte prøver blev analyseret for indhold af ochratoxin og mycophenolsyre (Jacobsen, 2021b).

Der blev udtaget prøver til toksinbestemmelse efter 20 dages inkubering, ved at det øverste lag med vækst af skimmel blev fjernet (som hvis man skar synlig skimmel af før servering). Der blev derefter udtaget et ca. 1-2 cm lag af leverpostejen, som blev overført til et mærket bæger og frosset indtil analyse (Jacobsen, 2021b).



Figur 2. Eksempel fra test af fermentaters effekt på skimmel vækst.

Leverpostejen er tilsat 5 eller 10% fermentat og podet med *P. brevicompactum*. (3) angiver Sacco LP 37, (2) angiver Holdbac, (1) angiver DMRI 5032, mens (Kontrol) er MRS-bouillon. Leverpostejerne er inkuberet aerobt ved 5°C i 20 dage.



Figur 3. Eksempel på vækst af *P. nordicum*. Efter 20 dages opbevaring ved 5°C var der kun svag vækst på alle postejer.

Resultater

Væksthæmning:

Brug af fermentater i koncentrationen 10% havde en lille væksthæmmende effekt. Skimmelkolonierne blev ca. 1-2 mm mindre i diameter (Jacobsen, 2021b).

Toksinproduktion:

Der blev ikke fundet ochratoksin i nogen af de analyserede prøver, uanset om der var tilsat fermentat eller kontrol-MRS. *P. nordicum* voksede dog også kun svagt ved lagringstemperaturen på 5°C.

Der blev fundet mycophenolsyre i kontrollerne uden fermentat. I leverpostej tilsat 10% fermentat fra Sacco LP37 var mængden af mycophenolsyre reduceret væsentligt (fra 1320/19 ppm til 46/5 ppm; NB: Bemærk stor variation i mængden af sekundær metabolit) (Jacobsen, 2021b).

For at undersøge, om *P. nordicum* DMRICC 9035 stadig kunne producere ochratoksin, blev 2 MEA-plader med sporstoffer podet med kulturen.

MEA-plader blev inkuberet ved 20°C, indtil de var overvokset med skimmel. På MEA-pladerne blev der påvist 81-89 ppb ochratoxin (validering af metode kemi lab.) (Anon, 2020).

Konklusion

Toksinanalyserne viste, at der ikke var målbare mængder af ochratoksin i leverpostej (figur 3), som var podet med *P. nordicum*, og som blev analyseret. Det skal dog bemærkes, at væksten af *P. nordicum* var svag ved 5°C.

I prøver podet med *P. brevicompactum* blev der fundet større eller mindre mængder af mycophenolsyre (figur 2). Der var meget stor variation mellem dobbeltbestemmelser, men det kunne af resultaterne tyde på, at postejer tilsat fermentat af Sacco LP 37 indeholder mindre mycophenolsyre end kontrolholdene.

Metode

Effekt af fermentater i kogt spegepølsemodel/kogt skinkemodel

For at undgå interaktion fra andre mælkesyrebakterier/starterkulturer blev der anvendt en kogt kødpølsemodel til forsøget. Produktet havde pH 5 og indeholdt 8% salt/vand ($a_w = 0,95$).

Skiver af produktet blev påført fermentat, tørret og punktinokuleret med skimmel. Skiverne blev placeret i petriskåle og inkuberet ved 20°C i 1 uge. Skimmelkoloniens diameter blev målt efter 3 og 7 dage.

Fermentatet blev fremstillet i 2 substrater:

Substrat 1: alm. MRS (2% sukker/dextrose)

Substrat 2: MRS tilsat ekstra 8% sukker (dextrose)

Følgende kulturer blev anvendt:

- Bitec LS-25
- *Lb. sakei* DMRICC 5032
- Microgard (Danisco) anvendes direkte, da det er et fermentat

Kontroller:

- Alm. MRS-B
- 10% K-sorbat

Penicillium brevicompactum

1% tilsætning af fermentat af Bitec LS 25 starterkultur og *Lb. sakei* DMRICC 5032 kunne hæmme vækst af *P. brevicompactum* efter 3 dages vækst. Også Microgard 210 fra Danisco gav lidt hæmning. Skimmelkolonierne målte 21-32 mm, og der var tydelige sporulering (grønne). Med hensyn til produktion af mycophenolsyre kunne der ikke konstateres nogen forskelle mellem behandlinger, hvor der var skimmelvækst. Alle fraktioner med skimmelmycelium (1-3 mm overflade af skiven) havde et højt indhold af mycophenolsyre, mens fraktioner uden skimmelmycelium (resten af skiven) havde et mellemniveau. Kun prøver helt uden skimmelvækst (K-sorbat) havde et ikke påvist eller lavt indhold.



Figur 4. Eksempel på skimmelvækst på pølseskiverne (*P. brevicompactum* på skiver med fermentat af Bitec LS 25 med 2 eller 10% glukose).

Penicillium nordicum

Fermentat af LS 25 fra MRS med 10% sukker og fermentat af *Lb. sakei* fra MRS med 2 eller 10% sukker gav en lille hæmning af *P. nordicum* med en diameter på 10-12 mm efter 3 dage. Ligeledes var der lidt hæmning med Microgard med en diameter på 10-11 mm. Kontrolhold uden hæmning var 14-17 mm.

Efter 7 dages inkubering var det ikke muligt at bedømme, om der var væksthæmning, da der var stor variation mellem gentagelser. Skimmelkolonierne målte 21-32 mm, og der var tydelige sporulering (grønne) på dag 7.

Med hensyn til ochratoksin A blev det ikke påvist i nogen af prøverne. Forsøg har vist, at stammen kan producere ochratoxin i overfladen af spegepølser og på agarplader. Måske er årsagen til, at der ikke ses toksinproduktion i dette forsøg, at produktet har et højt saltindhold, idet lav vandaktivitet er kendt for at nedsætte toksinproduktionen. Sonjak et al. (2011) har fx vist, at produktionen af OTA på agarplader opbevaret ved 25°C falder fra 47 enheder ved 5% NaCl til 8 enheder ved 10% salt.

0,1% K-sorbat gav fuldstændig hæmning af begge skimler efter både 3 og 7 dage. (Koch og Jacobsen, 2020).

Konklusion De testede fermentater kan reducere væksten af både *P. nordicum* og *P. brevicompactum* lidt, men har ingen effekt på produktion af mycophenolsyre fra *P. brevicompactum*.

Det er interessant, at der ikke kan måles ochratoksin i den anvendte spegepølse-model på trods af vækst af *P. nordicum*. Årsagen kendes ikke, men kan måske skyldes kombinationen af pH og saltindhold.

Metode **Effekt af mælkesyrebakterier i leverpostej**
Følgende blev undersøgt for antifungal effekt under lagring af leverpostej ved 5°C:

- mælkesyrebakterier påført overfladen af en bagt leverpostej

De anvendte skimmel var:

- *P. nordicum* DMRICC 9035 (ochratoksin)
- *P. brevicompactum* DMRICC 9003 (mycophenolsyre)

De anvendte mælkesyrebakterier var:

- *Lb. sakei* DMRICC 5032
- HOLDBAC YM-XPB LYO 500 DCU
- Sacco L.s.R. LP 37 (*Lb. plantarum*)

En kommerciel leverpostej blev hjemtaget direkte fra fabrikken. Overfladen blev podet med 1 ml udvoksede mælkesyrebakterier. Efter tørring blev postejerne punktinkuleret med skimmelsuspensionerne og lagret ved 5°C i 20 dage (aerobt i plastposer). Skimmeldiameteren blev målt, og udvalgte prøver blev analyseret for indhold af ochratoxin og mycophenolsyre (Jacobsen, 2021b).

Resultater Væksthæmning

Anvendelse af de levende kulturer på overfladen af en bagt postej gav ingen reduktion i væksten målt som diameter efter 20 dages opbevaring i plastpose (aerobt) ved 5°C.

Toksinproduktion

Der blev ikke fundet ochratoksin i nogen af de analyserede prøver, uanset om der var tilsat fermentater eller kontrol-MRS.

Der blev fundet mycophenolsyre i kontrollerne uden mælkesyrebakterier. I leverpostej podet med den levende kultur af Sacco LP37 var mængden af mycophenolsyre reduceret væsentligt (fra 2863/1974 ppm til 10/<1 ppm; NB: bemærk stor variation i toksindata).

Konklusion Toksinanalyserne viste, at der ikke var målbare mængder af ochratoksin i prøver, som var podet med *P. nordicum*, og som blev analyseret.

I prøver podet med *P. brevicompactum* blev der fundet større eller mindre mængder af mycophenolsyre. Der var meget stor variation mellem dobbeltbestemmelser, men det kunne af resultaterne tyde på, at postejer tilsat kulturen Sacco LP 37 på overfladen indeholdt mindre mycophenolsyre end kontrolholdene.

Metode

Effekt af mælkesyrebakterier i spegepølser (minispegepølser)

Der blev fremstillet minispegepølser af to forskellige farsere:

- 1) 2% salt, 0,8% dextrose, 100 ppm nitrit
- 2) 3,5% salt; 1,3% dextrose, 100 ppm nitrit

Pølserne blev fermenteret ved 24°C i 2 døgn. Herefter (på dag 3) blev temperaturen justeret til 18°C og derfra til 16°C, hvor pølserne blev tørret, indtil der blev opnået 20% svind (ca. 2 uger). Forsøgene blev gennemført over to omgange (I og II).

Svindet blev målt løbende ved vejning, og pH blev målt på dag 0, dag 2 og ved 20% svind (ca. 2 uger).

Farsen blev podet med kulturerne lige før stopning i collagentarm med 20-25 g pr. pølse. Efter stopning blev pølserne inokuleret på midten med et stik med en podenål uden øje. Der blev anvendt ufortyndet sporesuspensionsopløsning af: *P. nordicum* DMRICC 9035 (ochratoksin) og *P. brevicompactum* DMRICC 9003 (mycophenolsyre).

Skimmelvækst blev målt på dag 5 og dag 20.

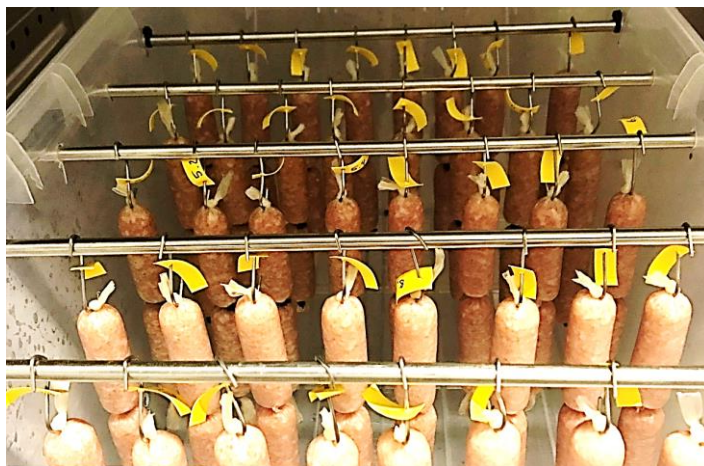
Toxinproduktion blev målt på dag 20. Pølserne blev delt i 2 fraktioner:

- a) skindet
- b) resten af pølsen

Den anvendte detektionsmetode for mycophenolsyre og ochratoksin havde en kvantificeringsgrænse på henholdsvis 2 ppb og 1 ppb.

Følgende stammer/kulturer blev testet:

- *Lactobacillus* sp. DMRICC 2223 (I)
- *Lb sakei* DMRICC 5032 (I)
- *Lb sakei* DMRICC 5025 (II)
- *Lb sakei* DMRICC 0045 (II)
- *Lb collonoides* DMRICC 4301 (II)
- Holdbac YM-XPX LYO 500 DCU (25 mg/100g) (I)
- Bitec LS-25 (25 mg/100g) (I)
- Chr. Hansen Bactoflavor Flora Italia (25 mg/100 g) (I)
- BioPrime SG48 safe top (Meat cracks) (II)



Figur 5. Minispegepølser anvendt til studie af kulturers antifungale effekt under fermentering og tørring.

Resultater samlet Alle afprøvede kulturer kunne sænke pH i pølserne til mellem 4,7 og 5,0 på dag 2. Kun *Lb. sakei* DMRICC 0045 havde ikke tilstrækkelig syringseffekt (pH 5,5). Efter 2 dage var syringen hurtigst i fars 1, selvom den indeholdt mindre glukose. pH-faldet i fars 2 var lidt mindre efter 2 dage, da fermenteringen formodentlig gik lidt langsommere pga. det høje saltindhold i fars 2. Efter 15 dage steg pH med alle kulturerne; dette skyldtes formodentlig skimmelvækst. Holdbac YM-XPK LYO var den kultur, der var bedst til at holde pH lavt.

- pH-fald

-væksthæmning Ingen kulturer kunne fuldstændigt hæmme skimmelvæksten.

Kulturerne Holdbac YM-XPK LYO (I), Bitec LS-25 (I), Chr. Hansen Bactoflavor Flora Italia (I) og BioPrime SG 48 (II) reducerede væksten af *P. nordicum* med ca. 20-50% ved endt produktion (20% svind).

Kulturerne Holdbac YM-XPK LYO (I); BioPrime SG 48 (II) og *Lb. sakei* DMRICC 5025 (kun fars 2) (II) reducerede væksten af *P. brevicompactum* med ca. 25-70 % ved endt produktion (20% svind).

Holdbac YM-XPK LYO og BioPrime SG48 havde begge en vis hæmmende effekt på de to penicilliumarters vækst på minispegepølserne (Jacobsen og Koch, 2021).

Kulturen BioPrime SG 48 havde den bedste hæmmende effekt på *P. nordicum*. Efter 15 dages produktion var væksten (diameter af skimmelkolonien) reduceret med 50% i forhold til pølser med mest skimmelvækst (Jacobsen, 2021c).

Væksten af skimlerne var ikke ens i de to forsøg. Diameteren på dag 20 var mindre i forsøg II end i forsøg I. Der blev ikke fundet nogen forklaring på dette.

-mycophenolsyre For *P. brevicompactum* var der sammenhæng mellem vækst og produktion af mycophenolsyre; mere vækst gav større mængde mycophenolsyre. Mængden af mycophenolsyre var størst i skindet, mens der var 4 til 10 gange mindre i pølsefarsen (Jacobsen og Koch, 2021).

Indholdet af mycophenolsyre var højt i alle skindprøver, bortset fra fars 2 tilsat kultur DMRICC 5025 og BioPrime SG 48 (Jacobsen, 2021c). De kulturer, som reducerede mængden af mycophenolsyre i mindst en fars, var: Bitec LS-25, *Lb. sakei* DMRICC 5032, BioPrime SG 48, *Lb. sakei* DMRICC 0045 og *Lb. sakei* DMRICC 5025.

-ochratoksin Ochratoksin A-dannelse hos *P. nordicum* synes ikke at være direkte relateret til vækst. Der var meget stor variation i toksinmængden mellem prøver, der burde være ens. Årsagen hertil er ukendt. I langt de fleste prøver var der ingen eller ganske lille produktion af ochratoksin. Kun en enkelt prøve havde et højt indhold i skindet, mens indholdet i selve pølsefarsen var næsten 100 gange mindre (Jacobsen og Koch, 2021, Jacobsen, 2021c).



Figur 6. Minispegepølser podet med *P. brevicompactum*. Fra venstre: BioPrime SG 48 dag 6 og dag 15; *Lb. collonoides* DMRICC 4301 dag 6 og dag 15.

Sensorisk bedømmelse af spegepølser produceret med antifungale kulturer

Metode

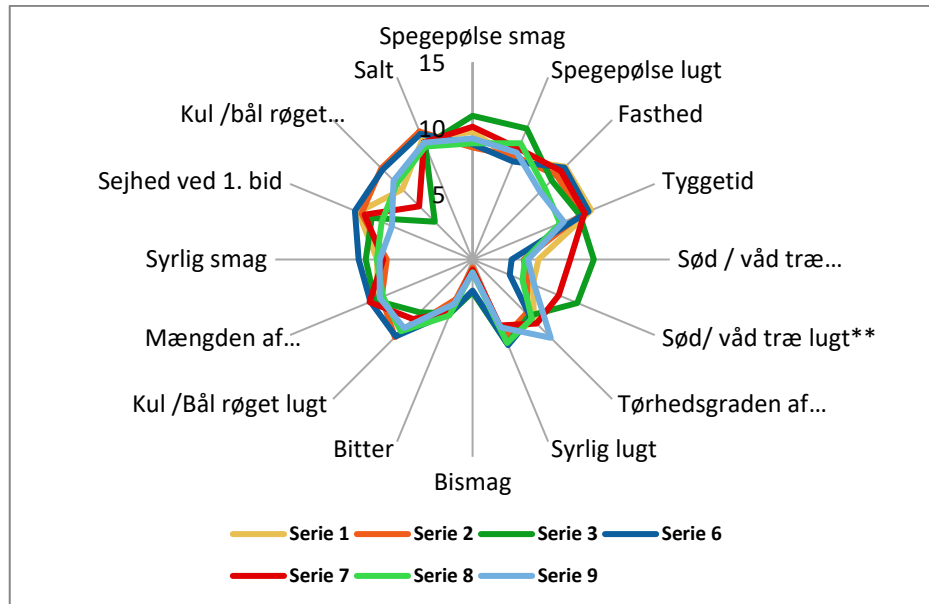
Baseret på screening og minispegepølseforsøgene blev følgende kulturer valgt til test af, hvordan de påvirker kvaliteten af fermenterede spegepølser (pH-fald og smag).

Sacco LP37
Danisco HOLDBAC YM-XPB
BioPrime SG48
DMRICC 5025

De blev testet alene og sammen med Flora Italica (Chr. Hansen-stamme, som ikke havde effekt i screeningsassay).

Kvalitet

2 kulturer (Sacco LP37 og DMRICC 5025) gav ikke et ønsket pH-fald i spegepølserne, når de blev anvendt alene. Disse spegepølser blev derfor ikke bedømt sensorisk. I kombination med en traditionel starterkultur fik pølserne det ønskede pH-fald. De bedømte spegepølser havde et acceptabelt pH-fald og svind. Ligeledes var tekstur, lugt og smag acceptable. Den opnåede smag var meget ens, og kun kulturen Bioprime SG48 adskilte sig i lugt/smag ved at have en mere fermenteret/sød/våd trælugt, både alene og sammen med en traditionel starter (serie 3 og 7 i figur 7) (Jacobsen, 2021d).



Figur 7. Smagsbedømmelse af spegepølser med korrekt pH-fald indenfor 48 timer. Serie 3 (BioPrime SG48) adskilte sig ved at have en sød/våd trælugt jf. det sensoriske panel. Af DMRI-eksperter blev den også karakteriseret som fermenteret/sydeuropæisk.

Konklusion

De testede kulturer gav acceptabel kvalitet. Dog skal kulturerne Sacco LP37 og DMRI-CC anvendes sammen med en kultur, der syrner produktet lidt hurtigere.

Metode

Antifungal effekt i spegepølser

Spegepølser, identiske med dem, som blev anvendt til sensorisk bedømmelse, blev i laboratoriet podet med skimmel og færdigtørret der.

Skimmelvæksten blev målt (diameter af kolonien) under tørringen, og ved endt produktion blev pølserne analyseret for ochratoksin og mycophenolsyre. Spegepølserne blev delt lige under området med skimmelvækst samt i et område 1-2 cm væk fra skimmelvæksten. Skindet med mycelium blev ikke analyseret.



Figur 8. Pilot plant producerede spegepølser. Tv: Pølserne blev podet på dag 6 efter stopning (3 dages fermentering, tørring ved 16°C og let røgning dag 5). Th: skimmelvækst ved endt produktion. Pølserne blev anvendt til toksinanalyser.

Toksinproduktion Analyser for toksin og sekundær metabolit blev lavet på en skive spegepølse udtaget lige under skimmelkolonien samt på en skive skåret 1 cm fra skimmelkolonien.

Ochratoksin

Der blev ikke fundet ochratoksin i nogen af de analyserede prøver. Detektionsgrænsen for analysen er 0,2 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Grænseværdien for svinenyrrer er 25 ppb i Danmark. Italien har en grænseværdi på 1 ppb i tørrede kødprodukter.

Mycophenolsyre

Der blev fundet mycophenolsyre i en koncentration på 1,7-2,2 ppb i 5 af 72 prøver. Alle andre prøver indeholdt ikke mycophenolsyre.

De positive prøver var tilfældigt fordelt, og der var ikke systematik i, om de kom fra et stykke pølse med skimmel eller fra et stykke pølse, hvor der ikke havde været skimmelvækst. Niveauet af mycophenolsyre var lavt og tæt på kvantificeringsgrænsen, som var 1 ppb (Jacobsen, 2021d).

Konklusion Resultaterne viser, at spegepølser tillader vækst af skimmel, men der kan ikke påvises ochratoksin og kun meget små mængder af den sekundære metabolit mycophenolsyre i produkterne.

Dette er i overensstemmelse med tidligere projektresultater (2004-2008, se nedenfor), hvor der heller ikke kunne detekteres ochratoksin i spegepølser. Kun i et enkelt forsøg blev der efter 4 måneders lagring fundet ochratoxin i pølseskindet med massiv vækst. I spegepølser podet med *P. brevicompactum* blev der efter 2½ måneders lagring fundet mycophenolsyre i spegepølsen.

Skimmel i kødprodukter (2004-2008)

Forekomst af skimmel i kødprodukter og produktionsmiljø Studiet undersøgte forekomst af skimmel i produktionsmiljøet på forskellige virksomheder, i forskellige afdelinger og på forskellige årstider. Der blev dels analyseret overflader ved svabring af 20 cm² samt nedfald på agarplader (64 cm²) i 2 timer.

Screeningen (n=146) viste denne fordeling i niveauet af skimmel i produktionsmiljøerne (n=146):

46% indeholdt <0,7 log cfu/20 cm² hhv. 0 CFU/2 timer
35% indeholdt 0,7-1,7 log cfu/20 cm² hhv. 1-5 CFU/2 timer
7% indeholdt 1,8-2,7 log cfu/20 cm² hhv. 6-10 cfu/2 timer
12% indeholdt >2,7 log cfu/20 cm² hhv. >10 cfu/2 timer

Skimmel blev ofte fundet i køletunneller med høj ventilation, røggeneratorer, røgesmuld, røgekamre samt vaskeanlæg, hvor forurenede udstyr m.v. blev håndteret.

Om efteråret indeholdt luften uden for virksomhederne store mængder skimmel-spore, især *Cladosporium*. Det betød, at luften i produktionslokalerne indeholdt flere skimmelsporer om efteråret end i foråret.

Fra produkterne blev der hyppigst isoleret Penicilliumarter af mange forskellige slags, og antallet var næsten konstant over året (Sørensen et al., 2008).

Ingredienser med antifungal effekt

Projektets formål var at belyse, hvilke forhold under produktion som kunne hindre vækst af skimlernes, men også at se på om æteriske olier (krydderier) kunne have en skimmelhæmmende effekt.

Et litteraturstudium viste, at der er publiceret mange artikler om væksthæmmende effekt af krydderier og krydderiolier. Nogle af de hyppigt undersøgte er: timian, nelliker, salvie, kanel, laurbær, rosmarin, citrongræs, citronmelisse, lavendel, sennep, oregano og basilikum. Effekten af krydderierne er primært testet på agar, hvor den skimmelhæmmende effekt ses ved koncentrationer på 500 ppm til >2000 ppm (opløst). Flere olier har bedre effekt i luftform fx sennep, hvor en koncentration på 1 µl/l har effekt. Kun få forsøg er gennemført i levnedsmidler. Generelt viser disse forsøg, at effekten er begrænset.

Timian, nelliker og kanel er fx testet i kagedej, men med begrænset effekt. Af undtagelser skal dog nævnes sennepsolie, som har god effekt mod skimmelvækst på rugbrød og MA-pakket ost.

Under litteraturstudiet er forskellige andre forbindelsers skimmelhæmmende effekt også vurderet. Litteraturen viser bl.a., at pakkegassen kan bruges til at reducere vækst af skimmel. Anbefalingen er at sikre så lav restiltkoncentration som muligt. Jo højere CO₂-koncentration, der anvendes, des bedre hæmning opnås. En anden mulighed er starterkulturer. En del lactobaciller hæmmer skimmel på agar. Effekten skyldes bakteriociner og lav-molekylære forbindelser, men resultaterne er ikke eftervist ved produktforsøg.

Organiske syrer som laktat og acetat har begrænset effekt. Propionsyre er godt i dej/brød, men ikke i pølser, og K-sorbat er godt i kødprodukter.

Andre forbindelser som fosfater (SPG, TSSP, SAPP, Brifisol 414) hindrer produktion af aflatoksin i agar, men dyppes frankfurter i fosfat-opløsninger, har det ingen effekt, og for fosfaterne SAPP og TSPP øges toksindannelsen. Ethanol har nogen effekt i laboratoriemidler, men der er ingen test, som viser, om det har effekt i levnedsmidler og produktionsmiljøer. Røgaroma har god effekt. På agarplader er effekten bedre end 2,5% K-sorbat og 3% propionsyre.

Baseret på litteraturstudiet er anbefalinger til hæmning af skimmelvækst:

- pH-fald til under 5,0 på 3 dage og tørring under produktion af spegepølser
- Overfladebehandling med K-sorbat
- Overfladebehandling med røg
- Ingen ilt i pakken og høj CO₂-koncentration

(Koch, 2008a)

Vækst under 2-3 ugers produktion af spegepølse

Produktion af spegepølser

-konklusion fra forsøg i 2004-2008

En række forsøg blev gennemført i DMRI's pilot plant for at fastlægge betydningen af forskellige produktionsprocesser og recepter. Den samlede konklusion er, at skimmelvækst kan styres ved at sikre et hurtigt pH-fald til under 4,8-5,0 på 2-3 døgn kombineret med en hurtig indledende tørring under 2-3 ugers produktion af spegepølse.

I spegepølser med pH >5 og langsom indledende tørring uden røg er der trods vækst af skimmel ikke påvist mykotoksin i færdigvarerne efter 2-3 ugers produktion.

Udblødning af tarme i K-sorbat (5%) samt røgning på fx dag 2 og 4 hæmmer vækst af skimmel under 2-3 ugers produktion af spegepølse.

Det vigtige er at sikre tørre overflader, idet kondens og fugtige overflader på spegepølserne øger risikoen for vækst af skimmel under tørring og røgning

Ligeledes er det effektivt at vaske skimmelmyceliet af, så snart det kan ses. Det reducerer mængden af toksin markant.

(Jacobsen, 2007a)

Undersøgelser, som danner baggrund for ovenstående anbefalinger, er baseret på pilot plant studier af vækst af *Penicillium brevicompactum* og *Penicillium nordicum*. I det følgende uddybes forsøgene lidt:

P. brevicompactum

Vækst af *Penicillium brevicompactum* kunne hindres på 3 forskellige pølserecepter under produktionen, når syrningen i løbet af 2 døgn nåede ned til omkring pH 4,5-4,7, og tørringen forløb med et svind på lidt mere end 1% i døgnet. I et tidligere forsøg, hvor der var kraftig vækst af *P. brevicompactum* i løbet af 6 dage, var der kun et pH-fald til 5,2 i løbet af 2 døgn. En hurtig syrning til pH under 5 er derfor tilsyneladende vigtig for at undgå skimmelvækst. Af de 3 pølserecepter: standard (A), fedtfattig (B) og fedtfattig med kartoffelflager (C), var det C, der gav den kraftigste skimmelvækst under aerob lagring ved 4-5°C. Dette skete, selvom recept C havde et meget lavt pH på 4,0, men årsagen kan være, at recepten indeholdt stivelse, som er et godt vækstssubstrat for mange skimler. Recept A havde den mindste skimmelvækst, og dette kan skyldes, at denne havde den højeste salt i vand-koncentration med 11,4% (færdigvaren) (Jacobsen og Koch, 2008a).

Et andet forsøg viste, at syrning til pH 4,6 eller 5,0 på 2-3 dage ikke hindrede vækst af *P. brevicompactum*.

Anvendelse af røg eller sorbat udsatte skimmelvæksten, men forhindrede den ikke. Den eneste kombination, som hindrede vækst af *P. brevicompactum*, var syrning til pH 4,6 samt brug af røg og K-sorbat til overfladebehandling.

Spegepølser med synlig vækst blev analyseret for mycophenolsyre. Analyserne viste, at der ikke blev dannet mycophenolsyre (<1 ppb) under de 2 ugers produktion af spegepølserne (Koch, 2008d).

P. nordicum *Penicillium nordicum* voksede ikke frem under produktion af de 3 forskellige spegepølser, hvor syrningen i løbet af 2 døgn nåede ned til omkring pH 4,7-4,5, og tørringen forløb med et svind på ca. 1,3% i døgnet (recept A, standard), 2,6% (recept B, lavt fedt) og 3,7% (recept C, kartoffelflager) (Koch og Jacobsen, 2008).

Et andet forsøg viste, at syrning til pH 4,6 eller 5,0 ikke hindrede vækst af *P. nordicum*.

Anvendelse af røg eller sorbat udsatte skimmelvæksten, men forhindrede den ikke. Den eneste kombination, som hindrede vækst af *P. nordicum*, var syrning til pH 4,6 samt brug af røg og K-sorbat til overfladebehandling.

Spegepølser med synlig vækst blev analyseret for ochratoksin. Analyser viste, at der ikke blev dannet ochratoksin (<1 ppb) under de 2 ugers produktion af spegepølserne (Koch, 2008d).

Toksinproduktion I forsøgene ovenfor er produkter med skimmelvækst blevet analyseret for indhold af ochratoksin og mycophenolsyre. Ved endt produktion på 2-3 uger blev der trods synlig vækst ikke påvist toksin. Årsagen hertil er ukendt.

Vækst under lagring af spegepølser og leverpostej

Overfladebehandling af fibertarme Nogle af ovennævnte produktioner blev lagret i 2½-4 måneder ved 4-5°C.

- sorbat Resultaterne viste, at K-sorbat anvendt som en 5% opløsning i oplødningsvandet til fibertarme ved produktion af spegepølserne kunne forhindre, at *P. brevicompactum* begyndte at vokse frem under en 2½ mdr. lagring ved 4°C. Det er en effektiv behandling, da kontrolholdet for fx recept C (kartoffelflager) og B (lavt fedt) var helt overvokset med skimmel, og kontrolholdet for recept A (standard) var 50% overvokset.
- sennepolie Sennepolietilsætning til oplødningsvandet var ikke nær så effektiv som K-sorbat, men gav en vis hæmning af skimmelvæksten.
- røgning Røgning var i dette forsøg næsten lige så effektiv som K-sorbat.

(Jacobsen og Koch, 2008a)

Toksinproduktion under lagring af spegepølser Spegepølser med kraftig skimmelvækst efter 2½ måneds lagring ved 4-5°C blev analyseret for mycophenolsyre. Disse pølser indeholdt mycophenolsyre. De højeste koncentrationer blev fundet i skind og den ydre del af pølserne (maks. 20.086 ppb). I centrum blev der kun fundet små mængder (<1 ppb til 4253 ppb) (Jacobsen og Koch, 2008a).

I forsøget med recept A, B og C (se ovenfor) blev pølserne efter endt produktion lagret ved 4-5°C (Koch og Jacobsen, 2008a).

Den kraftigste skimmelvækst blev fundet på spegepølse C (kartoffelflager, laveste pH på 4,2). Årsagen kan være, at recepten indeholdt stivelse, som er et godt

vækstsubstrat for mange skimler. Recept A havde den mindste skimmelvækst, hvilket måske kan skyldes, at denne havde den højeste % salt i vand.

K-sorbat anvendt som en 5% opløsning i oplødningsvandet til fibertarme ved produktion af spegepølserne kunne forhindre, at *P. nordicum* begyndte at vokse frem under en 4 måneders lagring ved 4-5°C.

Sennepsolietilsætning til oplødningsvandet var ikke helt så effektiv som K-sorbat, men gav en del hæmning af væksten af *P. nordicum*.

Røgning hæmmede også væksten af *P. nordicum*, men ikke så effektivt som K-sorbat, idet røgning ikke havde 100% inhiberende effekt på alle 3 recepter.

Vask i saltvand var også effektivt til at reducere den synlige vækst på alle recepterne.

De kemiske analyser viste, at der ikke blev produceret ochratoksin under aerob mellemlagring ved 4-5°C til trods for, at der var vækst af *P. nordicum* (Koch og Jacobsen, 2008a).

Spegepølser syrnede til pH 4,6, røget på dag 2 og dag 4 og tørret 30% resulterede i ingen vækst af *P. nordicum* og *P. brevicompactum* under produktionen på 2-3 uger. Ved endt produktion blev spegepølserne opbevaret 2-3 måneder i en plastpose (aerob) ved 20°C. I prøver podet med *P. nordicum* blev der påvist 1-4 ppb ochratoksin A i pølseskindet. I de spiselige dele af pølserne blev der ikke påvist ochratoksin A (<1 ppb). Der blev ikke analyseret for mycophenolsyreindhold i pølser podet med *P. brevicompactum* (Koch, 2006).

Pakkegassens betydning for skimmelvækst

Pakning af leverpostej i iltfri atmosfære med enten 100% N₂ eller 20/80% CO₂/N₂ kunne forhindre skimmelvækst i podede prøver på en kommercielt fremstillet leverpostej lagret ved 5°C og 8°C i 4 uger. Hvis postejen var pakket i atmosfærisk luft, var der synlig skimmelvækst efter 6 dages lagring ved 5°C eller 8°C. Både *P. nordicum* og *P. brevicompactum* kunne vokse på postejen pakket i atmosfærisk luft (Jacobsen, 2007c).

Konklusion pakning og mellemlagring

Baseret på ovenstående forsøg blev følgende anbefalinger givet:

- Iltfri pakning og køling mindsker eller hindrer vækst af skimmel.
- Brug af stivelse i farsen øger vækst af skimmel under aerob mellemlagring på køl.
- Udblødning af tarme i K-sorbat (5%) hindrer vækst af skimmel under aerob mellemlagring på køl.
- Røgning i kombination med hurtigt pH-fald hindrer vækst af skimmel under aerob mellemlagring på køl.
- Kraftig skimmelvækst efter 2-3 måneders mellemlagring af forsøgsspegepølser medfører, at der dannes mykotoksiner i produkterne. Ochratoksin blev kun fundet i skindet og den yderste overflade. Metabolitten mycophenolsyre blev fundet i størst mængde i skind og den yderste overflade samt i lave koncentrationer i midten af pølsen.

Æteriske olier og flydende røg til hæmning af skimmel

Æteriske olier
Effekt i leverpostej

Litteraturstudiet havde vist, at sennepsolie kan hæmme vækst af skimmel. Derfor blev to japanske produkter (plastlabels påført wasaouro) testet for hæmning af skimmelvækst. Ingen af de to typer wasaouro-labels kunne reducere skimmelvæksten fra hverken *P. nordicum* eller *P. brevicompactum* i leverpostej med den emballagetype, der blev anvendt i forsøget.

De mængder af wasaouro, som blev anvendt i dette forsøg, gav en afvigende smag i leverpostejerne. Smagen blev beskrevet som en prikkende/stikkende eftersmag.

Det blev konkluderet, at sennepsolie ikke er egnet til at beskytte kødprodukter mod skimmelvækst, når de er pakket i atmosfærisk luft og en iltgennemtrængelig emballage (plastlåg og wrap) (Jacobsen, 2008a).

Æteriske olier
Effekt på saltet kød

Eddikesyre og sennepsolie kunne heller ikke hindre vækst af *P. nordicum* og *P. brevicompactum* på overfladen af urøget bacon opbevaret aerobt ved 15°C.

Eddikesyre (40 µg/cm³) havde ingen væksthæmmende effekt på *P. nordicum* og *P. brevicompactum* under 3 og 7 dages aerob inkubation ved 15°C.

Sennepsolie (0,2 µg/cm³) havde ingen væksthæmmende effekt på *P. nordicum* under 3 og 7 dages aerob inkubation ved 15°C. Sennepsolie (0,2 µg/cm³) hindrede vækst af *P. brevicompactum* efter 3 dages aerob inkubation ved 15°C, men efter 7 dage var der ingen effekt af sennepsolien (Koch, 2008c).

Flydende røg

Brug af traditionel røg i røgovne har en hæmmende effekt på vækst af skimmel på overfladen af spegepølser (se ovenfor). En tilsvarende effekt er vist ved brug af atomizer-røg. Forsøgene viste en god inhiberende effekt af medium og meget røg efter 8 dage, men den bedste effekt var ved meget røg. Ved dag 16 var effekten den samme, og skimlen begyndte at vokse på spegepølserne (Christensen, 2018).



Figur 9. Spegepølser podet med *P. brevicompactum* ved dag 8 inden anden røgning. Venstre: reference; midt: medium røg; højre: meget røg (Christensen, 2018).

Vækst og toksinproduktion på tørrede skinker

Vask af tørrede skinker Friske, saltede og udlignede skinker blev podet med skimmel. De to penicilliumarter voksede begge hurtigt frem på de podede skinker under tørreprocessen. Efter 4 dage var der synlig vækst. Når skinkerne ikke blev vasket eller dampsuget, dannede penicillierne hhv. ochratoxin og mycophenolsyre.

Effekt på vækst og toksinproduktion

Ochratoxin Der blev fundet meget små mængder ochratoxin A i overfladefractionen af de ikke-vaskede skinker podet med *P. nordicum*. Koncentrationen var ca. 2 ppb både efter tørring og efter modning. Alle de vaskede eller dampsugete skinker podet med *P. nordicum* indeholdt <1 ppb ochratoxin A.

Mycophenolsyre På skinkerne dannede *P. brevicompactum* den sekundære metabolit mycophenolsyre i overfladefractionen, når den voksede. Vask i 4% saltvand reducerede mængden af mycophenolsyre med 30-50% under tørreforløbet. Damp sugning havde ingen tydelig effekt, hvorimod vask i 10% K-sorbatopløsning reducerede mycophenolsyreindholdet til 10-15% af indholdet i de ikke-vaskede prøver. K-sorbat forhindrede, at skimlen begyndte at vokse igen efter vasken. Ved endt tørring blev der ikke fundet mycophenolsyre af betydning i mellemfraktionen af skinkerne.

Skinkerne blev eftermodnet i en måned i vakuumpakning, men i nogle pakker holdt vakuummet ikke, og der blev dannet store mængder mycophenolsyre under modningen i hold, der ikke var vasket, og i hold, der var dampsuget. Det er derfor vigtigt, at skimlen er fjernet inden eftermodningen, så skimlen ikke kan vokse under denne lagringsperiode. I de modnede skinker blev der også målt mycophenolsyre i mellemfraktionen af skinkerne undtagen i hold, der var vasket i K-sorbatopløsning. Sorbinsyre kunne måles i såvel overflade som mellemfraktion i de hold, der var vasket med en K-sorbatopløsning (Jacobsen, 2007b).

Mærkningsregler Udblødning af tarme eller overfladebehandling af tørrede produkter med K-sorbat kan betyde, at de færdige produkter skal mærkes med E-nr. Det skyldes, at stofferne som kan måles i færdigvaren, og der have en effekt skal mærkes.

Konklusion tørret skinke Hvis saltede skinker forurenes med skimmel, kan disse vokse frem under tørreprocessen. Væksten af skimmel kan hindres ved forskellig overfladebehandling.

- Vask i 4% saltvand reducerer væksten og mængden af mycophenolsyre, som dannes.
- Vask i 10% K-sorbat er mere effektiv end vask i 4% saltvand til at hindre vækst og mindske mængden af mycophenolsyre.
- Vask sikrer, at der ikke dannes målbart ochratoxin i skinkerne

Rengøring og desinfektion

Forebyggelse af skimmel i produktionsmiljø Skimmel tilføres ofte produktionsmiljøet via luften. Af litteraturen fremgår det, at forekomst af skimmel kan mindskes ved at styre luftflowet i produktionsmiljøet og ved at sikre, at indblæsningsluften filtreres. For at rense luften for skimmelsvampe bør der anvendes filtre af F7/EU7-kvalitet eller finere. Hvis der er plads i

filterkassen, kan det være en fordel at montere et grovere og billigere filter, fx af G3/EU3-kvalitet foran et F7/EU7-filter. Nogle skimler etablerer sig muligvis i produktionsmiljøet eller tilføres via ingredienser eller hjælpestoffer.

For at undgå for meget pres på produktionsprocessen anbefales det derfor at undgå for store mængder skimmel i de råvarer og ingredienser fx krydderier, som anvendes til produktion af tørrede skinker og spegepølser. Årsagen er, at produkterne ikke gennemgår en varmebehandling, som inaktiverer skimmelsporer. Et forslag til grænseværdi for skimmel i ingredienser til fermenterede hhv. tørsaltede produkter er < 1000 cfu/g.

Desuden bør det sikres, at der ikke anvendes råvarer og ingredienser, som indeholder mykotoksiner fx kød fra dyr fodret med korn, hvor der har været vækst af skimler fx *P. verrucosum*, der kan danne ochratoxin, eller krydderier, vegetabilier og andre ingredienser, hvor skimmel har vokset og dannet toksiner.

Desinfektion

Med udgangspunkt i det begrænsede antal publikationer omhandlende desinfektionsmidlers effekt mod skimmel ser det ud til, at Rodalon (QAC, benzalkanium chlorid) samt klor er de midler, der har den bedste effekt mod skimmel. MEN de anvendte koncentrationer af klor er meget høje i forhold til det, der i dag anvendes industrielt. Ved den daglige desinfektion anvendes kun ca. 200 ppm klor (0,16% af en 12,5% opløsning), og ved kraftig desinfektion kan koncentrationen øges til 600 ppm.

Det bedste desinfektionsmiddel med effekt mod skimmel er således Rodalon (QAC, benzalkanium chlorid, som er identisk med alkyl-dimethyl-benzyl-ammonium-chloride).

Det skal bemærkes, at alle forsøgene er gennemført i suspensionsassay og ikke på overflader. Generelt gælder, at suspensionstest giver væsentligt større drabs-effekt af desinfektionsmidlerne end overfladeassay. Derfor er det et krav, at der skal gennemføres overfladeassay, når effekten af nye desinfektionsmidler skal dokumenteres (EN 13697:2001). Virksomhederne skal derfor være opmærksomme på, at der skal foreligge dokumentation for effekt i overfladeassay, når der vælges midler til desinfektion (Koch, 2008b).

Anbefalinger/Perspektivering

I det følgende samles konklusioner fra de gennemførte forsøg på DMRI i en række anbefalinger og vurderinger af risiko for forekomst af ochratoxin som følge af vækst af *P. nordicum* samt mycophenolsyre fra *P. brevicompactum*.

Spegepølser

Mælkesyrebakteriers hæmmende effekt: Mælkesyrebakterier producerer metabolitter, som kan reducere væksten af skimmel. Men væksten kan ikke elimineres. Derimod viser undersøgelser fra flere projekter og forsøg, at produktionen af ochratoxin og mycophenolsyre hæmmes kraftigt, så der kun kan påvises ochratoxin i spegepølserkindet og ikke i den spiselige del af spegepølsen. Produktionen af mycophenolsyre er ligeledes kraftig hæmmet og ses stort set kun i produktets overflade.

Pakkegas: Pakning uden ilt reducerer vækst af skimmel, men kan ikke hindre vækst.

Sorbat: Udblødning af tarme i K-sorbat er effektivt til at hindre vækst af skimmel på overfladen af spegepølser. Kan også med fordel anvendes til vask af spegepølser med skimmelvækst. Bemærk, at brug af sorbat skal mærkes, hvis der er målbare koncentrationer i færdigvaren.

Andet: Resultaterne fra de gennemførte forsøg i 2004-2008 samt i 2020-2021 viser, at der trods vækst af skimlernes *P. nordicum* og *P. brevicompactum* på overfladen af spegepølser ikke kan påvises ochratoksin og mycophenolsyre i den spiselige del af produktet, med undtagelsen af mindre mængder mycophenolsyre.

Det vurderes derfor, at det ikke er nødvendigt at kassere spegepølser med skimmelvækst; det vil være tilstrækkeligt blot at bortskære den del af produktet, hvor skimlen vokser. Da der i nogle forsøg er fundet lidt ochratoksin i overfladen, anbefales det at fjerne produkt i en afstand på 1 cm fra skimlen.

Det skal dog bemærkes, at internationale screeninger for forekomst af ochratoksin i kød og kødprodukter viser, at der ved fund af ochratoksin kan måles koncentrationer på 0,2-5 ppb og helt op til 691 ppb (bilag A). I reviewet er der dog ingen beskrivelse af fremstillingsprocedure, produktets opbevaring, pH eller vandaktivitet. Noget tyder på, at pH-faldet i pølserne ikke er så hurtigt som i dansk producerede spegepølser, men dette er ikke verificeret.

Et af de spegepølseprodukter, der er målt ochratoxin i, er den spanske pølse "salchichón". Dette produkt er kendetegnet ved langsomt pH-fald under saltning/modning/tørring ved 12°C i 26 dage. Toksinproduktionen kunne måles efter 14 dage, hvor pH fortsat var pH 5. Først i slutningen af produktionen, som er på 26 dage, blev der målt pH på 4,7 (Delgado et al., 2021).

Rodriguez et al. (2015) viste i et agarsystem bestående af salchichónpølse, at *P. nordicum* ikke producerede ochratoxin A ved a_w 0,87 og lagring ved 10°C. Ved a_w 0,84 var der ingen OTA-produktion ved op til 30°C. I studiet blev vækst og OTA-produktion af *P. verrucosum* også undersøgt. Her viste resultaterne, at kun ved a_w over 0,902 og temperaturer over 10°C kunne der måles OTA.

Mefta et al. (2018) testede, hvordan forskellige kombinationer af gær, starterkultur og skimmel kunne hindre produktion af OTA i et salchichón-baseret agarsystem (pH 5,3-5,5; a_w 0,95 hhv. 0,98) opbevaret ved 15°C og 20°C i 14 dage. Studiet viste, at skimlernes kunne vokse på agaren, men der kunne ikke måles OTA i substratet. Det er uvist hvorfor. Desværre er der ingen pH-målinger af mediet under de 14 dages inkubation. Den kommercielle starterkultur var Texel®ELCE Br (Danisco) bestående af *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus* og *Debaryomyces hansenii*.

Geisen (2004) viste i et studie på laboratoriemedier, at produktionen af OTA fra *P. nordicum* blev markant reduceret ved 15°C versus 25°C, og at der ved pH 4 var væsentlig mindre OTA-produktion end ved pH 5 og derover. Ligeledes blev det vist, at saltkoncentrationen ikke har nogen væsentlig betydning (bilag 2).

Det har således ikke været muligt fuldstændigt at verificere hypotesen om, at så længe pH er under pH 5 i en fermenteret spegepølse, så er der ikke risiko for produktion af OTA. Det er uvist, hvor grænserne for pH og temperaturer.

Tørrede skinker

Mælkesyrebakteriers hæmmende effekt: Effekten af mælkesyrebakterier er ikke testet i saltede tørrede skinker. Men det høje saltindhold vurderes at ville hæmme evt. vækst af mælkesyrebakterier, så der ikke opnås en hæmmende effekt overfor skimmel. Forsøg fra 2004-2008 har også vist, at når skimmel får lov til at vokse (ingen vask eller røgning), kan der dannes toksiner. Koncentrationen er størst i overfladen.

Pakkegas: Effekten er ikke undersøgt på tørrede skinker; men det vurderes, at effekten er sammenlignelig med det observeret for spegepølser og leverpostej.

Sorbat: Vask med K-sorbat er effektivt. Kræver mærkning på emballagen, hvis der kan påvises sorbat i produktet.

Andet: Generelt er vask/bortskaffelse af synlig skimmelvækst godt for at reducere mængden af toksin i tørrede skinker. Metoden anbefales for at hindre/reducere skimmeltoksiner i færdigvarerne. Vask bør foretages, så snart der er synlig hvid overfladevækst og skal efterfølges af tørring af overfladen evt. kombineret med røgning eller vask i K-sorbat.

Leverpostej

Mælkesyrebakteriers hæmmende effekt: Mælkesyrebakterier har ingen effekt på hæmning af skimmelvækst. Enkelte mælkesyrebakterier kan reducere produktion af mycophenolsyre.

Pakkegas: Iltfri pakning kombineret med kølelagring er effektivt.

Sorbat: Spray af overfladen er effektiv.

Andet: I studiet med massiv vækst af skimmel på overfladen af en hel leverpostej blev der fundet mycophenolsyre i produktet, men ved svag vækst blev der ikke fundet ochratoksin A.

Dette indikerer at afhængig af, hvor kraftig skimmelvækst der har været, kan et fraskær være tilstrækkeligt til at fjerne skadelige mykotoksiner. Ved kraftig skimmelvækst skal leverpostej kasseres.

Ved 5°C er væksten af *P. nordicum* meget langsom. Selv om det er generelt accepteret, at skimmel producerer mykotoksiner, når de er presset fx ved dårlige vækstbetingelser, viser projektets resultater, at der ikke kan måles OTA trods svag vækst ved 5°C.

Korte overordnede konklusioner

I det følgende gives helt korte anbefalinger for, hvordan kødprodukter sikres mod mykotoksiner.

Spegepølser

- OTA produceres ikke i den spiselige del af traditionelle danske spegepølser (pH<5), så længe pH ikke stiger
- Skindet med mycelium kasseres – kan indeholde lidt OTA
- Pletvis vækst af skimmel kan skæres væk (radius 1 cm fra kolonien), og resten af spegepølsen spises
- Ved synlig (hvid overflade) under produktion vaskes overfladen ASAP (saltvand eller sorbatopløsning), tør overfladen og tilføj evt. røg. Når vækst kun er svag, stiger pH ikke, og der produceres ikke OTA

Tørrede skinker

- OTA er kun påvist i den øverste del af de tørrede skinker
- MPS kan påvises i hele skinken, men højest i overfladen
- Ved synlig (hvid overflade) under produktion vaskes overfladen ASAP (saltvand eller sorbatopløsning), tør overfladen og tilføj evt. røg. Når vækst kun er svag og kortvarig, ses ikke OTA, og MPS-indholdet er reduceret, men ikke elimineret
- Fjernelse af skimmel er vigtig for at undgå mugsmag (OBS: I nogle sydeuropæiske produkter ønskes skimmelsmag)

Leverpostej

- Iltfri pakning og lagring ved 5-8°C reducerer vækst og hindrer OTA-produktion
- Sorbat hindrer skimmelvækst
- Skær overfladen med skimmelvækst i form af små kolonier væk – 1 cm under kolonierne. Resten kan spises, er fri for OTA. MPS kan påvises i op til 10 ppm
- Ved massiv skimmelvækst kasseres leverpostej. Sensorisk uegnet til konsum

Opfølgning

Ochratoxin produceres især af *Aspergillus ochraceus* (*A. ochraceus*) men også af *Aspergillus carbonarius* samt *Penicillium verrucosum* og *Penicillium nordicum*.

I tidligere undersøgelser har DMRI primært fundet penicillier i danske kødprodukter. Penicillier er blandt de hyppigst forekommende skimler i kølige lande, hvorimod *Aspergillus* oftere findes i varme lande. Derfor er studierne af danske spegepølser gennemført med *P. nordicum*.

For at styrke en beslutning om, at spegepølser med skimmelvækst er sikre at spise, dersom stykket med skimmel blot skæres fra 1 cm over skimmelkolonien (som for faste oste), vil det være interessant at få belyst, om det også gælder, hvis der har været vækst af andre ochratoxinproducerende skimmelstammer end dem, der er testet i dette projekt.

Det skal dog bemærkes, at der i pilot plant-produktionen af spegepølser heller ikke blev fundet mycophenolsyre i den spiselige del af spegepølser. Dette indikerer, at den traditionelle danske produktion af spegepølser med fermentering ved 24°C og tørring ved 16°C med hurtigt pH-fald er effektivt til at hindre toksinproduktion trods vækst af skimmel.

Hvis der kan sættes guidelines for, hvordan produktionen fx temperatur, pH-fald, tørringsforhold og vandaktivitet kan reducere skimmelvæksten så meget, at der ikke dannes mere toksin, end at fraskær af den del af produkter med synlig skimmel er tilstrækkelig i forhold til fødevarerikkerhed, vil madspild og tilbagekald kunne reduceres (som for hårde oste, hvor anbefalingen blot er, at man fraskærer stykket med skimmelvækst på hårde oste, FVST, 2021).

På leverpostej med svag vækst ved 5°C kunne der heller ikke påvises ochratoksin i laget lige under væksten, som blev skåret fra.

Samlet viser resultaterne fra DMRI-forsøgene, at OTA produceres i myceliet, hvor der er massiv skimmelvækst, og pH er over ca. 5. Ligeledes ses, at mængden af OTA reduceres væsentligt længere væk fra skimmelkolonien. Og i spegepølser er der ikke fundet OTA med undtagelse af i små pølser, som var helt overgroet og "fordøjet" af skimmel, så pH var steget til over pH 6.

Sammenholdes det med det foreslåede acceptable daglige indtag (se nedenfor), vurderes det, at skimmelvækst på traditionelle danske spegepølser ikke udgør en risiko, og at det er sikkert at spise resten af en spegepølse, efter at stykket med skimmel er skåret af i en omkreds af mindst 1 cm fra kanten af kolonien (figur 10).

WHO (2007) og EFSA (2006) har foreslået et tolerabelt daglig indtag af OTA på 100-120 ng/kg legemsvægt.

EFSA (2006) har estimeret, at den ugentlige eksponering for OTA er ca. 15-60 ng/kg legemsvægt. Det er lavt i forhold til den foreslåede grænse på 100-120 ng/kg legemsvægt.

Italien har en grænseværdi for forekomst af OTA på 1 µg/kg kødprodukt (cf Sanchez-Montero et al., 2019).



Figur 10. Illustration af fraskær 1 cm fra kolonien.

Det er fortsat uvist, hvorfor der ikke er ochratoksin A i danske spegepølser. Hypotesen fra dette projekt er, at det skyldes lavt pH i kombination med temperatur og i mindre grad tørringen (lav a_w). Røgprocessen er også en medvirkende årsag til, at skimler slet ikke får fat under produktionen. Men forsøget med kogte kødpølse-skiver med a_w 0,95 og pH 5 (8% salt/vand) lagret aerobt ved 20°C, hvor begge skimler voksede, og der blev produceret mycophenolsyre, men ikke ochratoxin, indikerer, at det er pH, som i kombination med temperatur og måske a_w hindrer produktion af OTA. De eneste forsøg, der viste målbar OTA, er screeningen i minispegepølser, hvor pH efter fermentering (24°C/2 dage) var under 5, men efter 15 dage med skimmelvækst ved (16-18°C) blev der i pølser med pH 5,5- 6,6 fundet OTA.

Referencer

Mælkesyrebakterier til hæmning af skimmelvækst og toksinproduktion (2020-2021)

Anon (2020) Ochratoksin A (OTA) og Mycophenolic Acid (MPA). Oprensning samt LC-MS/MS metode. P2008773.

EFSA (2006) Commission Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. [eur68134original.pdf \(fao.org\)](#)

FVST (2021) [Specifikke fødevarer \(foedevarestyrelsen.dk\)](#)

Petersen, E.B. (2020) Undgå toksinproduktion fra skimmel ved brug af mælkesyrebakterier. Litteraturstudium. P2007954.

Jacobsen, T. (2020a) Screening af mælkesyrebakterier fra DMRICC (projekt 2007954; 24.0.2020)

Jacobsen, T. (2020b) Screening af starterkulturer fra Chr. Hansen for væksthæmmende effekt på 3 forskellige penicillier (P2007954, 27.10.2020)

Jacobsen, T. (2021a) Screening af starterkulturer fra Danisco for væksthæmmende effekt på tre forskellige penicilliner (P2007954, 08.01.2021)

Jacobsen, T. (2021b) Afprøvning af fermentater og kulturer til at hæmme skimmel på leverpostej (P2008773, 23.09.2021)

Jacobsen, T. (2021c) Minispegepølser til screening for skimmelvækst II (P2008773, ???11.2021)

Jacobsen, T. (2021d) Pilot plant forsøg med spegepølser P2008773, ???12.2021)

Jacobsen og Koch (2021) Minispegepølser til screening for skimmelvækst og toksin, I (P2008773, 21.10.2021)

Koch og Jacobsen (2020) Test af fermentaters antifungale effekt i kødpølsemodel (P2007954, 23.11.2020)

Koch og Jacobsen (2021) Screening af starterkulturer fra Sacco S.r.L., Meat Cracks og Bitec for væksthæmmende effekt på tre forskellige penicilliner (P2008773, 17.08.2021)

Skimmel i kødprodukter (2004-2008)

Christensen, K. (2018) Flydende røgs antimikrobielle effekt mod gær og skimmel på spegepølser (projekt 2004277)

Jacobsen, T. (2007a) Undersøgelse af skimmelvækst og toksinproduktion i spegepølse, tørret skinke og leverpostej (version 2) (Projekt 18505, SF:34238.2)

Jacobsen, T. (2007b) Afprøvning af forskellige dekontamineringsmetoder ved vækst af *P. nordicum* og *P. brevicompactum* på tørret skinke (Projekt 18505, SF: 43237.1)

Jacobsen, T. (2007c) Pakkegassens betydning for vækst af skimmel på leverpostej (Projekt 18505, SF: 43626.1)

Jacobsen, T. (2008a) Sennepsolies effekt på skimmelvækst i wrappakket leverpostej (projekt 18553, SF47196.1)

Jacobsen og Koch (2008a) Vækst og mycophenolsyreproduktion af *Penicillium brevicompactum* på spegepølser under produktion og lagring (projekt 18553, SF: 47918.1)

Koch, A.G.L. (2006) Skimmelvækst og toksinproduktion i spegepølser fremstillet med og uden "vask" samt under opbevaring ved 8°C og 20°C i 3 måneder (Projekt 18505, SF: 35922)

Koch, A.G.L. (2008a) Litteraturstudium om æteriske olier og andre konserveringsmetoders effekt på vækst/drab af skimmel (Projekt 18553, SF:46821.1)

Koch, A.G.L. (2008b) Desinfektionsmidlers effekt mod skimmel - Et litteraturstudium (projekt 18553; SF:49726.1)

Koch, A.G.L. (2008c) Eddikesyre og sennepsolie til hæmning af skimmelvækst på overfladen af saltet kød (projekt 18553, SF: 49047.1)

Koch, A.G.L. (2008d) Vækst af skimmel på spegepølser med højt og lavt pH samt kombinationer af røgning og K-sorbat (projekt 18553, SF: 49137.1)

Koch og Jacobsen (2008) Vækst og ochratoxin produktion af *Penicillium nordicum* på spegepølser under produktion og lagring (projekt 18553, SF: 49480.1)

Sørensen, Marie Louise, Tomas Jacobsen, Per Væggemose Nielsen, Jens Christian Frisvad, Anette Granly Koch (2008) Mycobiota in the processing areas of two different meat Products. *Int J Food Microbiol*, May 10;124(1):58-64.

Internationale referencer

Delgado, J.; Rondan, J.J., Nunez, F. & A. Rodrigueez (2021) Influence of an industrial dry-fermented sausage processing on ochratoxin A production by *Penillium nordicum*. *Int. J. of Food Microbiology* 339 (2021) 109016.

Geisen, R. (2004) Molecular screening of environmental conditions influencing the induction of Ochratoxin A biosynthesis genes in *penicillium nordicum*. *Mol. Nutr. Food. Res.* 48, 530-540.

Guimaraes et al. 2018a, *Int. J. Food Microbiol.* 2;264:31-38.

Guimaraes et al. 2018b, *Food Additives & Contaminants*, 35: 1803-1818.

Mefta, S., Abid, S, Días, T and P. Rodrigues (2018) Effect of dry-sausage starter culture and endogenous yeasts on *Aspergillus westerdijkae* and *Penicillium nordicum* growth and OTA production. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 250-258.

Rodriguez, A., Capela, D., Medina, A., Cordoba, J.J. & N. Magan (2015). Relationship between ecophysiological factors, growth and ochratoxin A contamination of dry-cured sausage base matrices. *Int. J. of Food Microbiology* 194 (2015) 71-77

Silva Sonjak, Mia Licen, Jens Christian Frisvad, Nina Gunde-Cimerman (2011). Salting of dry-cured meat. A potential cause of contamination with the ochratoxin A-producing species *Penicillium nordicum*. *Food Microbiology* Volume 28, Issue 6, September 2011, Pages 1111-1116

Sánchez-Montero, L., Córdoba, J. J., Peromingo, B., Álvarez, M., and Núñez, F. (2019). Effects of environmental conditions and substrate on growth and ochratoxin a production by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium nordicum*: relative risk assessment of OTA in dry-cured meat products. *Food Res. Int.* 121, 604–611. doi: 10.1016/j.foodres.2018.12.025

WHO (2007) Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical report Series 947.

Ochratoxin A: Occurrence and carry-over in meat and meat by-products.
 A Review Tolosa, J., Ruiz, MJ., Ferrer, E., Vila-Donat, P. (Rev. Toxicol (2020) 37: 106-110)

Table 1. OTA occurrence in meat and meat derived products (data from 2010 to 2020).

Category product	Country	Incidence (%)	Total Contents mean±SD (µg/kg)	Total Contents range (µg/kg)	Reference
Raw ham muscle	Italy	100	2.21 ± 0.78	nr	Dall'Asta et al., 2010
Dry-cured ham		100	4.12 ± 0.98	1.99-5.65	
Salami		100	2.91 ± 0.27	2.58-3.32	
Commercial dry-cured ham		76	0.98 ± 0.16	nr	
Fermented sausages and dry-cured hams	Europe	4.5	109 ± 51	nr	Sørensen et al., 2010
Game sausages	Croatia	93.33	nr	<0.05 - 3.07	Markov et al., 2013
Semi-dry sausages		84		<0.05 - 3.28	
Fermented dry-meat products		54		<0.05-7.83	
"Slavonski Kulen" Homemade Slavonian sausage	Croatia	-	5.68 ± 1.58	nr	Pleadin et al., 2013
Homemade sausage			6.87 ± 2.01		
Smoked ham			6.3 ± 1.5		
Smoked ribs			4.51 ± 0.11		
Bacon			5.7 ± 0.25		
Poultry and games	France	-	0.2	nr	Sirot et al., 2013
Offal			0.2		
French delicatessen meats			0.25		
Kidney (pig)	Croatia	nr	15.31 ± 3.11	nr	Peršić et al., 2014
Liver (pig)			8.81 ± 2.08		
Lungs (pig)			13.51 ± 2.65		
Heart (pig)			5.26 ± 2.43		
Spleen (pig)			5.81 ± 1.62		
Muscle tissue (pig)			5.61 ± 2.01		
Adipose tissue (pig)			4.59 ± 1.68		
Blood (pig)			6.35 ± 2.49		
Cooked meat products (pig): Black pudding sausages			13.82 ± 3.12		
Liver sausages			13.38 ± 3.83		
Pâté	9.13 ± 2.78				
Beef luncheon Beef burger	Egypt	100	3.23 4.55	0.30-8.3 2.7-7.6	Abu-Eignany & Sallam, 2015
Istrian prosciutto	Croatia	20	0.78 ± 2.14	0.98-9.42	Pleadin et al., 2015
Dalmatian prosciutto		14.8	0.33 ± 0.82	1.56-3.16	
Slavonian ham		13.6	0.16 ± 0.39	0.97-1.29	
Other prosciutto		33.3	1.82 ± 3.37	2.23-9.95	
Dry-fermented sausages: "Slavonski Kulen"		5.7	0.08 ± 0.30	0.95-1.52	
Istrian type		7.1	0.14 ± 0.53	1.15-2.64	
Slavonian type		7.1	0.11 ± 0.40	1.07-2.35	
Northern type		6.6	0.21 ± 0.81	0.99-5.10	
Slavonian type		7.2	0.07 ± 0.26	0.95-1.23	
Northern type		5.9	nd	nd	
Cooked sausages: Liver sausages	11.1	0.26 ± 0.79	1.12-3.13		
Pâté	nd	nd	nd		
Sausage	China	10	0.5	0.5	Zhao et al., 2015
Pork		nd	nd	nd	
Pig liver	nd	nd	nd	nd	
Fresh salamis	Italy (Veneto)	nd	20.9	0.06-103.69	Armorini et al., 2016
Aged salamis		nd			
Sopressa (typical Venetian salami)		16			
Swine muscle	China	20	0.88	0.88	Cao et al., 2018
Swine liver		nd	nd	nd	
Chicken muscle		nd	nd	nd	
Chicken liver		20	1.05	1.05	
Salami	Italy	10	39.2	1.14-691	Merla et al., 2018
Salami	Italy	13	0.51 ± 0.32	0.07-5.66	Altafini et al., 2019
Muscle (fresh)	Italy	100	0.078 ± 0.011	nr	Meucci et al., 2019
Muscle (seasoned)			0.178 ± 0.031		
Backfat (fresh)			0.085 ± 0.025		
Backfat (seasoned)			0.204 ± 0.069		
Salami			0.064 ± 0.004		
Mortadella	0.558 ± 0.016				
Dry fermented sausages	Croatia	nr	nr	0.22-2.17	Pleadin et al., 2019
Dry-cured meat products		9		0.47-5.35	
Cooked sausages		5		0.32-4.12	
Pork dry-cured legs	Portugal	43	14.9 ± 27.9	<1 -99.1	Rodrigues et al., 2019
Pork shoulder hams		18	6.6 ± 6.2	<1-14.7	
Goat dry-cured legs		nd	nd	nd	
Sheep dry-cured legs		nd	nd	nd	
Istrian sausages	Croatia	4.7	0.25 ± 0.01	0.25	Kudumija et al., 2020
Slavonian sausages		25.9	0.27 ± 0.09	0.17-0.38	
Kulenova Seka		22.7	0.26 ± 0.14	0.14-0.48	
Special sausage		nd	nd	nd	
Istrian prosciutto	Croatia	28.6	5.04 ± 1.50	2.74-6.86	Zadravec et al., 2020
Dalmatian prosciutto		15.6	3.56 ± 1.32	2.16-5.39	
Istrian domestic sausage		7.3	2.97 ± 0.20	2.74-3.12	
Slavonian domestic sausage		7.4	3.89 ± 0.35	3.64-4.14	
Kulenova Seka		8	3.14 ± 0.40	2.85-3.42	

nd: not detected.
nr: not reported.

Betydning af salt, pH og temperatur for OTA-produktion (Geisen, 2004)

Mol. Nutr. Food Res. 2004, 48, 532–540

Molecular monitoring of ochratoxin A biosynthesis

537

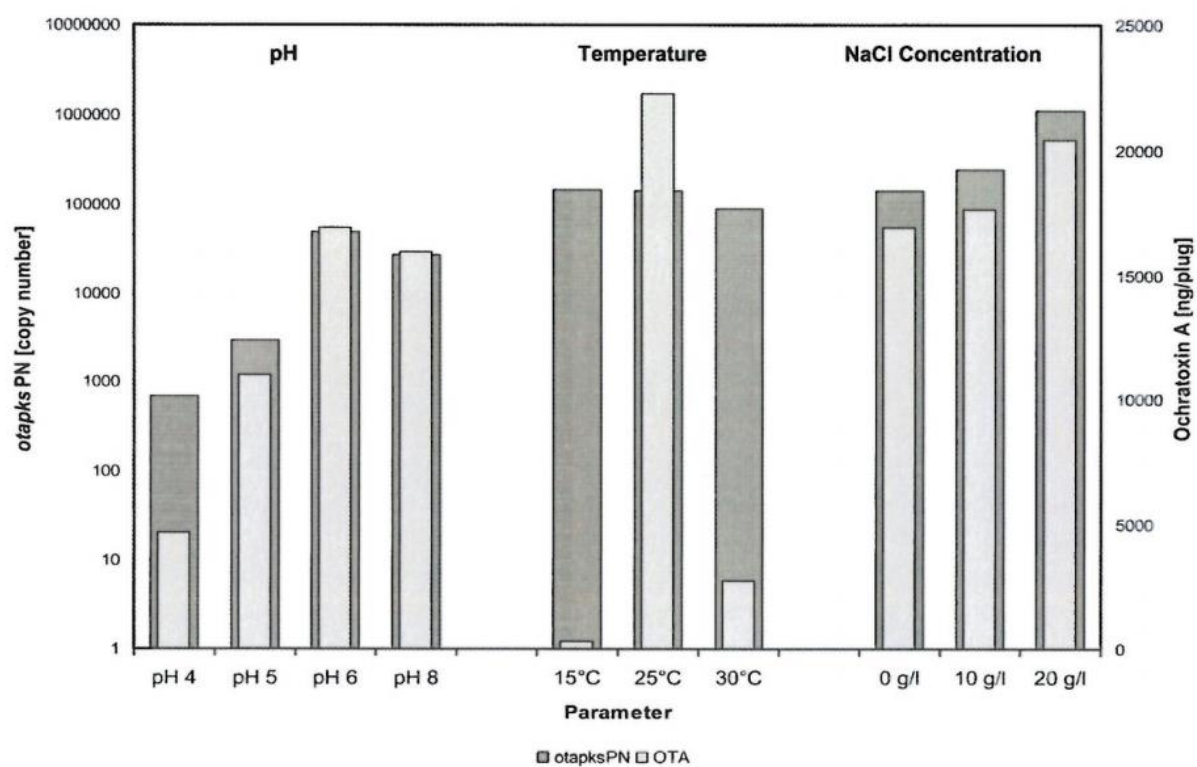


Figure 3. Expression of the *otapksPN* gene (shaded) and ochratoxin A production (hatched) by *P. nordicum* BFE487 after incubation on YES medium for 5 days at different parameters.