



Slutrapport

Guideline til produktion af sikre og tørrede produkter

Opsamling af resultater fra DMRI-forsøg

Tomas Jacobsen og Birgit Groth Storgaard

22. februar 2022

Proj.nr. 2008772

Version 1

BGS/MT/TJAN

	Sammendrag
<i>Formål</i>	Ved produktion af saltede og tørrede produkter som tørret Mortadella og saltet og tørret skinke er det karakteristisk, at a_w, temperatur og pH løbende ændres under den langvarige saltnings-, saltudlignings- og tørringsproces. Formålet med dette projekt har været at undersøge, om realistiske dynamiske forhold for a_w, temperatur og pH har en indflydelse (fx hæmmende effekt) på vækst og toksinproduktion af <i>Bacillus cereus</i> og <i>Staphylococcus aureus</i>. Desuden har projektet haft til formål at undersøge mulige tiltag, som kan hindre en evt. toksindannelse. Slutrapporten sammenfatter de resultater, der er opnået i projektet "Vækst og toksinproduktion af <i>Bacillus cereus</i> og <i>Staphylococcus aureus</i> i tørrede kødprodukter" fra perioden 2020-2021. Proj. nr. 2008772. Resultaterne sammenholdes med det tidligere SAF-projekt "Matematisk model til vurdering af henfald af patogener (Projekt P2003841)".
<i>B. cereus toksin, cereulide</i>	Cereulide (emetisk toksin) dannes af nogle <i>Bacillus cereus</i> og <i>B. weihenstephansensis</i> ved vækst ved en lang række forskellige temperaturer. Cereulide dannes i fødevarer og er modstandsdygtigt overfor et bredt pH-interval (2-12) og varmestabilt ved 90 min ved 121°C (intet tab af aktivitet). Cereulide er et depsipeptid dvs. et peptid, hvor en amidgruppe er erstattet af den tilsvarende ester. Cereulide produceres af non-ribosomale peptidase systemer. Cereulide består af en sekvens af 4 aminosyrer gentaget 3 gange. Det toksiske niveau er bestemt til 12-32 µg/kg (bestemt i en lille abe; <i>Suncus murinus</i>). Ved indtagelse af cereulide er inkubationstiden kort, 1-5 timer, og symptomerne er typisk kvalme og opkast (Lund, 2000). Den infektiøse dosis af <i>B. cereus</i> er 10^5-10^8 cfu/g. Dvs. der skal være 10^5-10^8 cfu/g til stede i fødevaren, førend <i>B. cereus</i> producerer tilstrækkeligt cereulide til at kunne forårsage en fødevarerforgiftning (Granum et al., 2014; Lund, 2000).
<i>Fødevarerforgiftning forårsaget af B. cereus</i>	Fødevarerforgiftning forårsaget af <i>B. cereus</i> er ikke rapporteringspligtig (Lund 2000). Derfor kendes omfanget ikke af fødevarerforgiftning forårsaget af <i>B. cereus</i>.

S. aureus toksin

Staphylococcus enterotoksin dannes i fødevarer og er modstandsdygtigt overfor frysning og varmestabilt ved almindelig pasteurisering (endda også sterilisering af dåseprodukter) fx 20 min ved 121°C (Lund, 2000).

Det toksiske niveau er svært at bestemme, da dosis er individafhængig og påvirkes af faktorer som fx vægt og immunologisk status. Inkubationstiden er kort, 2-4 timer, og symptomerne er typisk kvalme, opkast, mavekrampe og diarré (Lund, 2000).

Den infektiøse dosis vurderes at være min. 10^6 cfu/g (Lund, 2000).

Der er i nærværende projekt anvendt et mix af *S. aureus* stammer, der tilsammen producerer toksin A, B, C og D (Staphylococcus enterotoksin SEA, SEB, SEC, SED).

Den nedre grænse for enterotoksinproduktion er omkring 10°C. Ved denne temperatur foregår toksinproduktionen langsomt (Lund, 2000).

Der produceres ikke enterotoksin i fødevarer ved pH under 5,0. Optimal pH ligger på 7,0-8,0.

Forsøgsdesign

Der er i løbet af 2020 og 2021 udført fire challengetests og holdbarhedsforsøg, hvor modelprodukterne tørret mortadellapølse og saltet, tørret skinke er blevet podet med *B. cereus* og *S. aureus* på forskellige procestrin (se tabel 1).

Der foreligger særskilte planer og rapporter med praktisk beskrivelse af de enkelte delforsøg samt resultatbehandling.

Links til tekniske rapporter:

[Challengetest 1 mortadella Rapport Final.pdf](#)

[Challengetest 2 mortadella Rapport Final.pdf](#)

[Challengetest 3 skinke Rapport Final.pdf](#)

[Challengetest 4 skinke Rapport Final.pdf](#)

Tabel 1. Oversigt over udførte challengetest og holdbarhedsforsøg. Test 1 og 3 er udført i 2020, mens test 2 og 4 er udført i 2021.

	Råvarebehandling	Kontaminering	Tørring (% svind)	Lagring v. 25°C
<u>Test 1</u> <u>Mortadella</u> <u>pølse</u>	i. 2 farsrecepter (4% salt, 4% salt/nitrit), ii. I alt 2 produktvarianter	i. Fars ii. Rekontaminering efter varmebehandling og inden tørring.	15	14 dage (3 mdr.)
<u>Test 2</u> <u>Mortadella</u> <u>pølse</u>	i. 1 fars (4% salt/nitrit) ii. I alt 8 produktvarianter	i. Fars ii. Rekontaminering efter tørring	20, 25, 30	6 mdr.
<u>Test 3</u> <u>Tørret</u> <u>skinke</u>	i. Tørsaltning og udligning i vakuumpose (90 dg v. 5°C) ii. 3 saltninger (4% salt, 4% salt + nitrit, 5% salt) iii. I alt 3 produktvarianter	i. Råvare før tørsaltning ii. Rekontaminering før tørring	20	7 dage
<u>Test 4</u> <u>Tørret</u> <u>skinke</u>	i. Tørsaltning i kar ii. Udligning 50 dg v 5°C. iii. 3 saltninger: tørsaltning i kar i hhv. 4, 5 og 6 dg iv. I alt 3 produktvarianter	i. Råvare efter saltning/før tørring	30	2 mdr.

Challengetest 1. Mortadellapølse (a_w 0,927 efter tørring)

Når mortadellafars med 4% salt med/uden nitrit (a_w 0,927 efter tørring) kontamineres med *S. aureus* og *B. cereus*, og mortadellapølsen dernæst rekontamineres efter varmebehandling (og inden tørring), ses der vækst af *Staphylococcus aureus* under tørring og efterfølgende lagring ved 25°C.

S. aureus producerer toksin i detekterbare niveauer hen mod slutningen af tørringsprocessen og i markante niveauer under 14 dages lagring ved 25°C.

Der ses ikke vækst af *Bacillus cereus*, men heller ikke henfald. Ligeledes dannes der ikke *B. cereus* toksinet, cereulide, under hverken tørring eller lagring ved 25°C.

De opnåede data er afprøvet i modellen "Safety of dried meat products" ver. 1. For tørrede pølser stemmer data overens for *Staphylococcus aureus* mht. slutniveauet, mens modellen overprædikerer vækst af *Bacillus cereus* med ca. 1,5 log CFU/g i løbet af den i alt 110 dage lange lagringsperiode. 1,5 log over så lang tid svarer til en meget lav vækstrate, som ligger inden for den usikkerhed, der kan forventes af modellen.

Challengetest 2. Mortadellapølse (a_w 0,889-0,911 efter tørring)

Når mortadellafars med 4% salt og 100 ppm nitrit kontamineres med *S. aureus* og *B. cereus* og dernæst varmebehandles samt tørres til hhv. 20, 25 og 30% svind (a_w 0,889-0,911 efter tørring), ses der en varmeinaktivering efter varmebehandling. Der ses ingen vækst af *S. aureus* og *B. cereus* samt ingen toksindannelse under tørringen.

Hvis mortadellapølser rekontamineres med *S. aureus* og *B. cereus* efter tørring og inden vakuumpakning og dernæst lagres ved 25°C, ses der ingen vækst eller toksindannelse af *B. cereus* efter 6 måneders lagring ved 25°C.

Derimod ses der vækst af *S. aureus* i forskellige grader under lagring ved 25°C. For færdigtørrede mortadellapølser, hvor kun farsen er kontamineret med *S. aureus*, ses der i varierende grad vækst af *S. aureus* under lagring ved 25°C. Vækst af *S. aureus* er størst i produkter med høj vandaktivitet.

For færdigtørrede mortadellapølser, der er rekontamineret inden vakuumpakning og lagring ved 25°C, ses der vækst af *S. aureus* uafhængigt af tørringsgrad og a_w . Vækst af *S. aureus* er dog størst i produkter med høj vandaktivitet.

Desuden dannes der ikke stafylokoktoksin i mortadellapølser, hvor kun farsen er kontamineret med *S. aureus*, efter lagring ved 25°C. Hvis færdigtørrede mortadellapølser rekontamineres med *S. aureus*, kan der dannes et højt indhold af stafylokoktoksin efter lagring ved 25°C allerede efter 3 mdr. Indholdet er størst i mortadellapølser med højest vandaktivitet (tabel 2).

Ovenstående gælder både for mortadella fremstillet hos DMRI og et kommercielt fremstillede produkt.

Når data fra mortadellapølse, der er tørret til a_w 0,90 eller fra kommercielt fremstillet produkt med a_w 0,89, sammenlignes med modellen, overestimerer modellen kraftigt vækst af *S. aureus*. Modellen finder, at *S. aureus* vil vokse ca. 2 log under tørringen og derefter vokse til 8,2 log CFU/g på ca. 20 dage ved 25°C. I dette forsøg blev det observeret, at der for ikke-rekontaminerede produkter med lav vandaktivitet blev fundet ca. 2 logs vækst af *S. aureus* i løbet af 200 dages lagringsperiode. For produkter med lav vandaktivitet, der blev po-det efter varmebehandling, blev der fundet maks. 5-6 log CFU/g af *S. aureus* efter 125 dages lagring.

Modellen forudser et stort fald af *B. cereus* under lagringen ved 25°C på ca. 10 log CFU/g i løbet af 200 dage. I praksis blev der fundet et fald på 1,5 til 3 log CFU/g.

Tabel 2. Oversigt over produkt-karakteristika, tilvækst af *Staphylococcus aureus* under hhv. tørring og lagring samt mulighed for dannelse af toksin under hhv. tørring og lagring ved 25°C

A_w ^A	%salt ^A	Efterkontaminering	Staph vækst (Δ kimtal)		Mulighed for toksindannelse	
			Under tør-ring	Lagring v. 25°C	Under tør-ring	Lagring v. 25°C
0,927	5,1	Ja, før tørring ^B	4,4-5,4	0-0,7	ja	ja
0,889-0,911	4,7-5,3	Nej ^C	0	1,5-4,3	nej	nej
0,889-0,911	4,7-5,3	Ja, efter tørring ^D	0	1,5-3,5	nej	ja

^A Målt efter tørring

^B Råvare er kontamineret med 2,7-2,8 log cfu/g, færdigtørret pølse er efterkontamineret med 2,5-2,8 log cfu/g

^C Råvare er kontamineret med 3,0 log cfu/g

^D Råvare er kontamineret med 3,0 cfu/g, færdigtørret pølse er efterkontamineret med 1,9-3,1log cfu/g

Challengetest 3
Skinke (a_w 0,912-
0,938 efter tørring)

Tørrede skinker (a_w 0,912-0,938 efter tørring) viser ca. 3,5 logs vækst af *Staphylococcus aureus* under tørring og efterfølgende lagring ved 25°C. Der er ikke vækst af *Bacillus cereus*, men heller ikke henfald.

Der dannes ikke stafylokoktoksin under saltudligning og tørring, men der ses en kraftig dannelse af stafylokoktoksin efter kun 1 uges lagring ved 25°C. Tilsvarende dannes der kun en smule *Bacillus* toksin. De målte mængder af cereulide er mange gange lavere end de mængder, der er angivet ved udbrud, hvor mængden i fødevarerne har varieret fra 1 til 85 µg/g fødevare (Rouzeau-Szynalski et al., 2020). De mængder, der er fundet i dette forsøg, er få ng/ml.

Opnåede data er afprøvet i eksisterende model. For tørrede skinker spår modellen henfald af *Bacillus cereus*. Modellen er lavet med vegetative celler af *Bacillus*, mens den tørrede skinke er podet med sporer af *Bacillus*. Det kan ikke forventes, at sporer bliver reduceret ved fremstillingen af skinker, og da der ikke ses sporespiring og vækst af *Bacillus*, er der ingen uoverensstemmelse mellem modellen og de opnåede resultater i skinke.

For *S. aureus* viser modellen hurtig vækst, når skinkerne lagres ved 25°C. Dette stemmer godt overens med dette forsøg, hvor der ses vækst og toksinproduktion i den uge, hvor temperaturen er 25°C.

Challengetest 4
Skinke (a_w 0,872-
0,896 efter tørring)

Tørrede skinker (a_w 0,872-0,896 efter tørring) viser begrænset vækst af *Staphylococcus aureus* under tørring og 1-4 logs vækst under den efterfølgende lagring ved 25°C. Der er ikke sporespiring og efterfølgende vækst af *Bacillus cereus*, men heller ikke henfald.

Der dannes stafylokoktoksin under tørring/modning og den efterfølgende lagring ved 25°C undtaget for skinke med a_w 0,872 (højest saltkoncentration og lavest a_w), hvor der ikke sker yderligere dannelse af stafylokoktoksin under lagring ved 25°C. Tilsvarende dannes der intet/kun spor af *Bacillus* toksin, cereulide.

Opnåede data er afprøvet i eksisterende model. For tørrede skinker spår modellen henfald af *Bacillus cereus*, hvilket stemmer overens med de opnåede resultater.

Når data, som er så tæt på processen for de 3 skinkeopskrifter som muligt, lægges ind i DMRI Predict modellen "Safety of dried meat products", fås et fald i *L. monocytogenes*, *Salmonella* og (STEC) *E. coli*.

Modellen prædikerer:

- henfald af *Bacillus* under produktion under lagring ved 25°C.
- henfald af Staph under produktion og vækst under lagring ved 25°C.

Der ses ligeledes et fald i antallet af *Bacillus cereus*. Modellen er lavet med vegetative celler af *Bacillus*, mens den tørrede skinke er podet med sporer af *Bacillus*. Det kan ikke forventes, at sporer bliver reduceret ved fremstillingen af skinker, og da der ikke ses sporespiring og vækst af *Bacillus*, er der ingen uoverensstemmelse mellem modellen og de opnåede resultater i skinke.

For *S. aureus* prædikterer modellen 3 logs fald under tørring og herefter hurtig vækst til maksimalt niveau (>9 log), når skinkerne lagres ved 25°C. Dette gælder for alle 3 produkttyper (a_w 0,872, 0,892 og 0,896) uafhængigt af a_w /saltindhold.

Dette stemmer ikke helt overens med de udførte forsøg, hvor der i stedet observeredes begrænset vækst af *S. aureus* (knap 1 log) under tørring og 1-4 log vækst under lagring ved 25°C for alle 3 produkter.

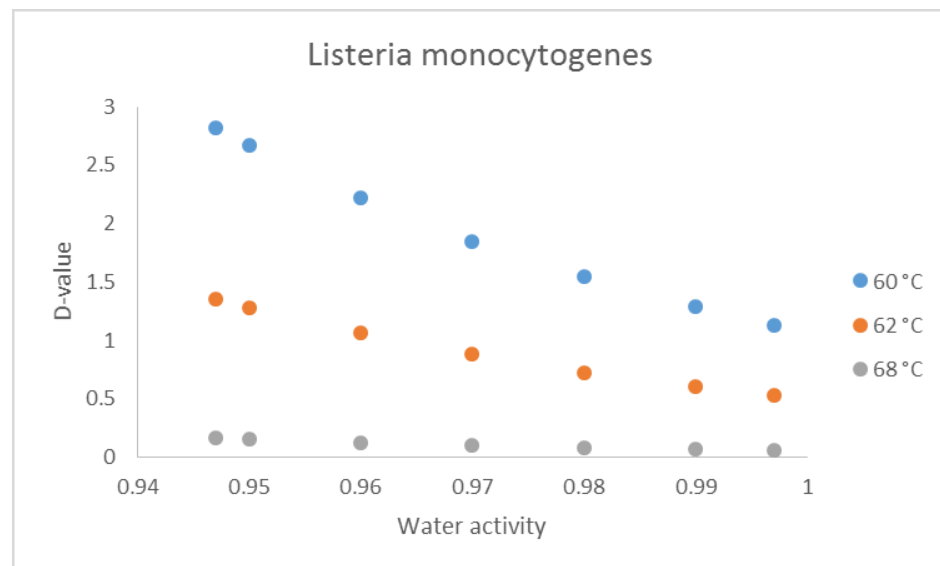
For *S. aureus* overestimerer modellen henfald af *S. aureus* under tørring, hvor der i de udførte forsøg observeres knap 1 log vækst. Når skinkerne lagres ved 25°C, overestimerer modellen vækst af *S. aureus*, idet der forudsiges >9 logs vækst, mens der kun observeres 1-4 logs vækst for *S. aureus*.

Diskusion

På baggrund af de forholdsvis få data i dette studie skal den generelle guideline ikke ændres på det foreliggende grundlag.

Der ses fremvækst af *Staphylococcus aureus* under og efter tørring af mortadellapølser. Umiddelbart efter varmebehandling findes ingen *Staphylococcus*. Hvis der er overlevende *Staphylococcus aureus* efter varmebehandling, er de under detektionsgrænsen. Varmebehandlingen svarer til mindst 2 min. ved 72°C. Varmebehandlingen burde inaktivere vegetative bakterier, men det er velkendt, at D-værdien øges væsentligt, når a_w falder.

Herunder et eksempel med *L. monocytogenes* beregnet fra Combase.



For *Staphylococcus aureus* finder Asselt og Zwietering (2006), at D-værdien ved 70°C er 2,14 min., når der anvendes 95% konfidensinterval på resultater på 204 publicerede D-værdier. Gennemsnitsværdien ved 70°C er 0,26 min., så der er tilsyneladende stor variation i *Staphylococcus aureus* stammers varmeresistens.

Det er på baggrund af de fundne resultater, hvor modellering af vækst/henfald ved statiske forhold for a_w , pH og temperatur skal vise resultater for dynamiske processer for de samme parametre, ikke muligt at modelere, hvordan vækst/henfald af *S. aureus* og *B. cereus* vil foregå i produkterne.

Konklusion

Bacillus cereus

Vækst og toksindannelse af *Bacillus cereus* er ikke et problem i de saltede og tørrede modelprodukter, som er undersøgt i projektet. Modelprodukterne er podet med en suspension af vaskede *B. cereus* sporer. Teoretisk set vil der dog også være ca. 10% vegetative celler i suspensionen. Kimtallene for *B. cereus* viser tilstedeværelse, men hverken vækst eller henfald, uanset hvilket produkt der er blevet undersøgt. Der er således ingen ændring i kimtal under saltning, tørring og efterfølgende lagring ved 25°C. Dette skyldes, at a_w på overfladen af skinker og i mortadellapølserne har været under 0,92, hvor *B. cereus* har vækstgrænse ([Bakterieskema maj 2017.pdf \(foedevarestyrelsen.dk\)](#)), eller at kombinationen af a_w , pH og temperatur har umuliggjort vækst af *B. cereus*. *B. cereus* danner ikke toksin af betydning, idet der kun i meget begrænset omfang kan detekteres toksinet cereulide. Det findes kun på sporniveau på nogle få ng/ml, og det regnes for ubetydeligt.

Staphylococcus aureus

For saltede og tørrede mortadellapølser viser det sig, at når råvaren (farsen) er kontamineret med *S. aureus*, og produktet ellers håndteres hygiejnisk korrekt efter varmebehandling og tørring, er der ikke risiko for dannelse af *S. aureus* toksin i modelprodukterne i op til 6 mdr. lagring ved 25°C.

Vækst og toksindannelse af *Staphylococcus aureus* kan blive et problem i mortadellapølser ($a_w > 0,88$), hvis produktet bliver kontamineret efter varmebehandling og/eller tørring, og samtidig lagres ved 25°C i op til 6 måneder.

I saltede og tørrede skinker kan *S. aureus* i nogle tilfælde danne toksin under tørring og lagring ved 25°C. Vandaktiviteten er betydende for, hvor meget toksin der kan dannes. Jo lavere vandaktivitet og jo højere salt% – desto mindre toksin.

Guideline

Ved produktion af saltede, tørrede kødprodukter er det vigtigt for fødevarer sikkerheden af produkterne, at produktionsparametrene eller oplagingsforholdene ikke giver anledning til vækst af patogene bakterier.

For de fleste saltede og tørrede produkter indeholder fremstillingsprocessen ikke et enkelt trin, der fx som en varmebehandling kan inaktivere patogene bakterier.

Derfor er det vigtigt at anvende råvarer og ingredienser, der ikke har for høje kimtal.

Fremstillingsprocesserne skal derudover følge enkelte regler.

Kødprodukterne skal saltes ved lave temperaturer $< 5^{\circ}\text{C}$, indtil overfladen på produkterne har nået en a_w på $< 0,92$. Ved en vandaktivitet lavere end 0,92 er det kun *Staphylococcus aureus*, der kan vokse i produkterne. Hvis temperaturen er $< 22^{\circ}\text{C}$, vil *S. aureus* dog ikke kunne producere toksin.

Selvom a_w er $< 0,92$, kan *S. aureus* vokse og begynde at producere toksin, hvis temperaturen er over 22°C .

Produkter, der opbevares ved højere temperatur ($> 22^{\circ}\text{C}$), må have et a_w , som er $< 0,90$ for at forhindre vækst og toksinproduktion af *S. aureus*, eller fx have et lavt pH på $< 5,0$. I disse tilfælde kan a_w være op til 0,96, hvis opbevarings-temperaturen er $< 22^{\circ}\text{C}$.

Opdatering af HACCP Bilag F2 nr. 100 På baggrund af de gennemførte forsøg, er HACCP Bilag F2 nr. 100 "Tørring og røgning af saltede kødstykker f.eks. bacon, røget filet" blevet opdateret til nedenstående

B. cereus Hindring af vækst hindrer toksindannelse.

Cereulid dannes ved temperaturer over 10°C .

B. cereus vokser ikke ved $a_w < 0,92$ (Faktablad A)

Vækst og cereulid produktion hindres ved at kombinere saltning, tørresvind og temperatur under produktion. Eksempler på sikre processer er:

- Der ses ingen vækst og cereulid produktion ved saltning med 4% NaCl under tørring ved 16°C til 30% svind på 3,5 uger (24 dage) til a_w 0,91 og efterfølgende lagring ved 25°C og pH 6,2 i 6 mdr
- Der ses ingen vækst og cereulid produktion under tørring til 30% svind på 10 uger til a_w 0,90 ved 8°C og efterfølgende lagring ved 25°C og pH 6,8 i 2 mdr
- Væksthæmning er ikke påvirket af om der anvendes 0 eller 100 ppm nitrit

S. aureus Der ses ingen opformering eller toxindannelse i røget filét (4,9% salt/vand, 0 hhv. 60 ppm nitrit) under saltning og røgning. ($55^{\circ}\text{C}/3$ timer) og nedkøling til under 10°C på 4 timer.

Hæmning af vækst og toksindannelse afhænger af, hvordan temperatur, pH og a_w kombineres. Nogle eksempler er:

- Ved tørring og opbevaring ved max 22°C og pH 6,8 er der ikke risiko for vækst og toksinproduktion, når a_w er mindre end 0,92

- Ved temperaturer på 25°C og pH 6,6 skal aw være max 0,87 for at hindre vækst og toksinproduktion (Storgaard/Jacobsen)
- Ved 25°C og pH 6,2 ses ingen toksinproduktion ved aw under 0,91
- Ved max 22°C og pH < 5,0 hindres vækst og toksin produktion ved aw på max 0,96

Referencer

1. Granum, PE; Arnesen, L. Stenfors; From, C. 2014 Encyclopedia of Food Safety, vol 1, pp 356-363.
2. Lund, B.M. & Peck, M.W (2000) *Staphylococcus aureus*, kap. 47 in The Micro-bio-logical safety and quality of food. ed.Lund, B.M., Baird-Parker, T.C. & Gould, G.W., Aspen Publishers, Inc, Gaithersburg, Maryland.
3. Rouzeau-Szynalski, K., Stollewerk, K., Messelhäuser, U. Ehling-Schulz, M. (2020) Why be serious about emetic *Bacillus cereus*: Cereulide production and industrial challenges. Food Microbiology 85, 103279.
4. van Asselt, E.D., Zwietering, M.H. (2006) A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. Int. J. Food Microbiol 107,) 73 – 82