



Notat

Validering af *C. botulinum*-modellen

Validering af botulinummodellens anvendelse på vakuumpakkede produkter

6. januar 2026

Proj.nr. 2012299

Version 1

Init. NBS/MT/TJAN

Baggrund

Botulinummodellen på DMRI Predict er udviklet på baggrund af data fra varmebehandlede kødprodukter pakket i modificeret atmosfære (MA) med 30% CO₂ og 70% N₂ i pakkegassen. CO₂ virker hæmmende på de fleste gram-negative for-dærvelsesbakterier og kan medvirke til at forlænge holdbarhed. For *Clostridium botulinum* er effekten af 30% CO₂ i pakkegassen dog mindre entydig ifølge litteraturen. Det er derfor uvist, om vækst af *C. botulinum* i produkter pakket i modificeret atmosfære med 30% CO₂ er sammenlignelig med vækst i vakuumpakkede produkter. Det vides derfor ikke, om botulinummodellen også kan benyttes til vakuumpakkede produkter som fx sous vide-produkter.

Formål

Formålet er at undersøge, om vækst af psykrotrofe *Clostridium botulinum* er ens i pølser pakket i hhv. MAP og vakuum baseret på challengetest med podede varmebehandlede pølser, som pakkes både i MA-pakning og i vakuumpakning for at vurdere, om botulinummodellen også kan benyttes til at prædiktere sikkerhed af vakuumpakkede produkter.

Konklusion

Da der i 4 ud af 37 undersøgt kombinationer af salt/vand%, pH, tilsat Na-nitrit, tilsat Na-laktat og lagringstemperatur blev observeret vækst af *C. botulinum* i pølse-skiver pakket i vakuum og ikke i MA-pakkede pølse-skiver, konkluderes det, at **botulinummodellen ikke kan benyttes til at prædiktere sikkerhed ift. vækst/ikke-vækst af *C. botulinum* i vakuumpakkede produkter**. Modellen kan således ikke benyttes til fx sous vide-produkter.

I flere forsøg blev det observeret, at vækst i vakuumpakker kommer forud for vækst i MAP. Det konkluderes derfor, at modificeret atmosfære (30% CO₂/70% N₂) har en hæmmende effekt på sporespiring og/eller vækst af *C. botulinum*.

Fremgangsmåde

Følgende stammer af *C. botulinum* (ikke-toksinproducerende) blev udvalgt til forsøg baseret på deres evne til at danne luft i forforsøg:

- 3765Px
- 3778Px
- 3779Px
- 3780Px

Tre af stammerne (3778Px, 3779Px og 3780Px) er desuden de samme stammer, der blev benyttet til at udvikle botulinummodellen på DMRI Predict sammen med 3760Px.

De 4 kulturer blev taget fra fryserør og opformeret i 10 ml TPGY (30°C/3 dg) i anaerobbænk. Den opformerede kultur blev anvendt til at pøde 1 ml i vandet i Cooked Meat Medium (CMM), 2-fase substrat i anaerobbækken. Kulturerne blev igen inkuberet ved 30°C i anaerobbænk i 10-14 dage. For høst af sporerne blev væskefasen af substratet suget op og centrifugeret ned i afkølet centrifuge (4°C) ved 5.000 rpm. i 15 min. Supernatanten blev fjernet og pellet resuspenderet i 20 ml steril iskold NaCl (2%). Sporerne blev gemt på køl ved 4°C til næste dag. Der blev bestemt sporetal for hver af stammerne efter varmebehandling i vandbad ved 75°C i 20 min. Sporetallene blev bestemt på RCM (30°C/3 dg) i anaerobbækken.

Farsfremstilling, podning, pølse-stopning, varmebehandling, slicing og pakning i MAP og vakuum

Farser til pølsefremstilling blev produceret i pilot plant dagen før podning med sporer, pøsestopning og varmebehandling. De blev opbevaret ved 2°C natten over. Grundrecepter samt procedure for podning af fars, stopning af pølser, varmebehandling samt slicing og pakning i Lab M findes i bilag 1-5.

Inkubering

Efter pakning blev prøverne fordelt ved hhv. 5°C og 8°C (og i enkelte tilfælde 10°C) og lagret i op til ca. 56 dage. Serie C1 blev dog lagret ved hhv. 4°C, 7°C og 10°C.

Kemiske analyser

Fra hver serie blev begge pølseender (ca. 100 g) fra 2 forskellige pølser efter varmebehandling skåret fra og sendt til kemisk analyse i Lab K. Pølseenderne blev placeret i separate poser.

Der blev lavet enkeltbestemmelse på 2 skiver fra hver serie. Følgende analyser lavet:

- pH
- salt
- vand
- laktat (kun serier, hvor der blev tilsat laktat)

Der blev desuden taget en stump pølse ud fra hver serie, som blev frosset ned i Lab M og gemt, i tilfælde af der var brug for ekstra analyser.

Mikrobiologiske analyser

Pølseskiver pakket i vakuum blev undersøgt for gasproduktion visuelt efter ca. 2, 4, 6 og 8 ugers lagring.

Ved tydelige luftproduktion i vakuumpakker blev der udtaget 3-5 vakuumpakker og 3-5 MA-pakker. Pakkerne blev åbnet i anaerobbænk og prøven stomacheret i FKP, som havde stået fra dagen før i anaerobbænken. Bakterierne blev spredt på RCM-agar (dybdeudsæd) i fortynding -1 til -3. RCM blev valgt frem for SFP-agar, da forforsøg viste, at kimtallene på de to substrater var ens, og at det var nemmere at tælle kolonier på RCM-agar.

Pladerne blev inkuberet ved 30°C i 3 dage i anaerobbænken, hvorefter pladerne blev taget ud og talt. Der blev fremstillet en ekstra RCM-agar (-1 fortynding), som blev taget ud af anaerobbænken og inkuberet aerobt ved 30°C som kontrol af, om der var vækst af fakultativt anaerobe bakterier i prøverne.

Resultater

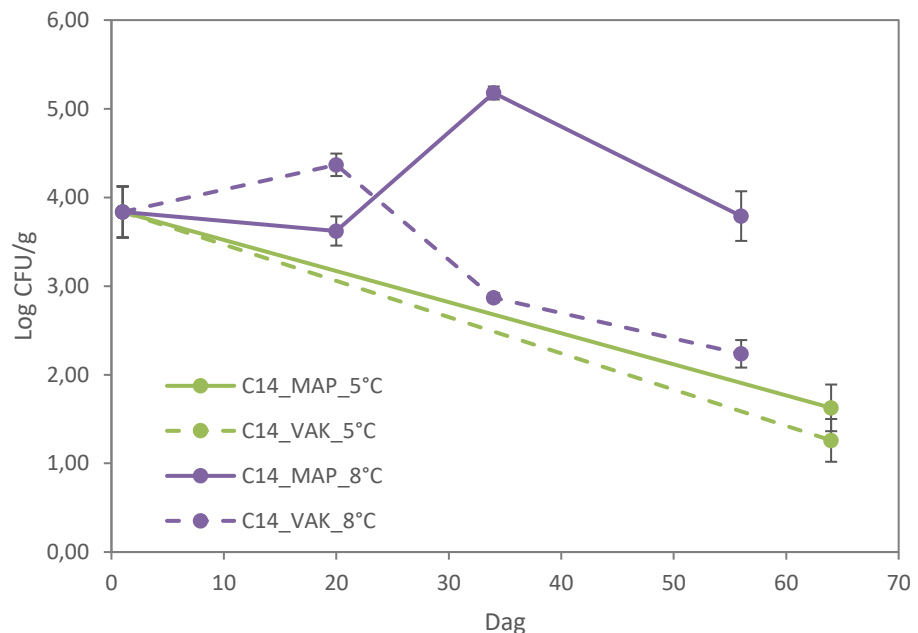
Resultater over sammenligning mellem vækst/ikke-vækst op er opsummeret i tabel 1.

Tabel 1. Opsummering af vækst/ikke-vækst af *C. botulinum* i hhv. vakuumpakker og MA-pakker. Gul indikerer, at der er forskel på vækst i vakuum og MAP.

ID	Type	Salt/ vand (%)	pH	Na-Nitrit tilsat (ppm)	Na-Laktat tilsat (%)	Lagringstemperatur	Vækst i vakuumpakker	Vækst i MA-pakker	Overensstemmelse mellem vakuum og MAP
C1	Kød	2,2	6,4	0	0	4°C	nej	nej	+
						7°C	ja	ja	+
						10°C	ja	ja	+
C2	Hybrid	2,9	6,4	0	0	5°C	nej	nej	+
						8°C	ja	ja	+
C3	Hybrid	2,0	6,8	60	0	5°C	ja	nej	-
						8°C	ja	ja	+
C4	Kød	2,7	6,7	0	0	8°C	ja	ja	+
C5	Kød	2,7	6,8	0	1,5	5°C	nej	nej	+
						8°C	nej	nej	+
C6	Kød	3,4	6,7	0	1,5	5°C	nej	nej	+
						8°C	nej	nej	+
C7	Kød	2,8	6,7	0	3	5°C	nej	nej	+
						8°C	nej	nej	+
C8	Kød	2,0	6,8	60	0	8°C	ja	ja	+
C9	Kød	2,7	6,8	60	0	5°C	nej	nej	+
						8°C	ja	nej	-
C10	Kød	2,0	6,8	60	1,5	5°C	nej	nej	+
						8°C	ja	nej	-
C11	Kød	2,0	6,9	60	3	5°C	nej	nej	+
						8°C	nej	nej	+
C12	Kød	2,7	6,9	0	0	5°C	nej	nej	+
						8°C	ja	ja	+
C13	Kød	3,3	6,9	0	0	5°C	nej	nej	+
						8°C	ja	nej	-
C14	Kød	2,0	7,0	0	1,5	5°C	nej	nej	+
						8°C	ja	ja	+
C15	Kød	2,0	7,0	0	3	5°C	nej	nej	+
						8°C	nej	nej	+
C16	Kød	3,4	6,7	0	0	10°C	ja	ja	+
C17	Kød	3,4	6,3	0	0	5°C	nej	nej	+
						8°C	nej	nej	+
C18	Kød	2,5	6,3	60	0	5°C	nej	nej	+
						8°C	nej	nej	+
C19	Kød	1,9	6,3	0	3	5°C	nej	nej	+
						8°C	nej	nej	+
						10°C	nej	nej	+

Som det ses i tabel 1, blev der i 4 ud af de 37 undersøgte kombinationer af salt/vand%, pH, tilsat Na-nitrit, tilsat Na-laktat og lagringstemperatur fundet uoverensstemmelse mellem observeret vækst i vakuumpakker og i MA-pakker. I alle 4 tilfælde blev der observeret vækst i vakuum, men ikke i MAP. Det vil altså sige, at der i et betydeligt antal tilfælde vil være risiko for vækst af *Clostridium botulinum* i et vakuumpakket produkt, selvom botulinummodellen på DMRI Predict prædikerer, at vækst i et tilsvarende MA-pakket produkt ikke er sandsynlig.

I figur 1 ses et eksempel på vækstkurver for *C. botulinum* i pølseskiver pakket i vakuum eller i modificeret atmosfære. I eksemplet her ses det, at selvom der ved 8°C både observeres vækst i vakuum og MA-pakker, så er lagfasen kortere i vakuum end i MAP, hvilket indikerer, at modificeret atmosfære (30% CO₂/70% N₂) har en hæmmende effekt på sporespiring, som ikke er til stede i vakuum.



Figur 1. Vækstkurve for *C. botulinum* i serien C14 pakket i vakuum eller i modificeret atmosfære.

Det skal noteres, at størstedelen af forsøgene er lavet ved pH-værdier, der ligger udenfor (højere end) det pH-interval, som botulinummodellen på nuværende tidspunkt dækker. Der er begrænset viden om effekten af CO₂ på sporer og mekanismen bag, men for vegetative celler vil effekten være mindre, jo højere pH er. Det er derfor ikke sandsynligt, at CO₂ vil have mindre antimikrobiel effekt og derfor, at vækst af *C. botulinum* i vakuum og MAP vil være mere ens ved lavere pH, end ved pH ca. 6,8, hvor de fleste forsøg her er foretaget.

Konklusion

Da der i 4 ud af 37 undersøgt kombinationer af salt/vand%, pH, tilsat Na-nitrit, tilsat Na-laktat og lagringstemperatur blev observeret vækst af *C. botulinum* i pølseskiver pakket i vakuum og ikke i MA-pakkede pølseskiver, konkluderes det, at **botulinummodellen ikke kan benyttes til at prædiktere sikkerhed ift. vækst/ikke-vækst af *C. botulinum* i vakuumpakkede produkter**. Modellen kan således ikke benyttes til fx sous vide-produkter.

I flere forsøg blev det observeret, at vækst i vakuumpakker kommer forud for vækst i MAP. Det konkluderes derfor, at modificeret atmosfære (30% CO₂/70% N₂) har en hæmmende effekt på sporespiring og/eller vækst af *C. botulinum*.

Grundrecepter for pølser

	Kødpølse	
Ingrediens	kg	Ca. %
0.2 M NaOH	1,500	15,00
Is/vand	0,620	6,20
1313 bov (udbenet)	5,220	52,20
Snitter u. svær (2034)	1,700	17,00
Kaseinat EMHV	0,140	1,40
Kartoffelmel	0,370	3,70
Sojakoncentrat	0,140	1,40
Na-ascorbat	0,003	0,03
Dextrose	0,100	1,00
Vakuumsalt	0,140	1,40
Nitritsalt (0,6%)	0,00	0,00
Purasal pulver (100% Na-laktat)	0,00	0,00
Na-tripolyfosfat (104G)	0,050	0,50

	Hybridpølse	
Ingrediens	kg	Ca. %
Is/vand	2,300	23,00
1313 bov (udbenet)	3,500	35,00
Snitter u. svær (2034)	0,500	5,00
Sojakoncentrat	0,400	4,00
Ærteprotein (pisane M9)	0,500	5,00
Rød peber i strimler	0,600	6,00
Løg i tern	0,300	3,00
Gulerødder	0,600	6,00
Søde kartofler (frost, blancheret)	0,600	6,00
Kartoffelmel	0,400	4,00
Na-ascorbat	0,003	0,03
Phosphat (104G)	0,030	0,30
Carragenan (GENUGEL WR-78)	0,100	1,00
Vakuumsalt	0,080	0,80
Nitritsalt (0,6%)	0,100	1,00
Purasal pulver (100% Na-laktat)	0,000	0,00
Total	10,013	100,130
Ønsket samlet vægt	10,000	

Procedure for podning af fars

Der skal podes 5 kg fars i alt pr. serie. De 5 kg fordeles i 3 pølser.

Da sporerne af clostridierne helst ikke skal spire, gælder det om at holde farsen så kold som mulig under podning og stopning.

Der podes 5 kg fars med 13 mL sporesuspension

Farsen podes med cocktail i "Store Bjørn" (mixer):

- 1) Skovlen fastspændes "Store Bjørn"
- 2) Fars hældes i skålen, og sporesuspension spredes forsigtigt rundt i farsen (pas på ikke at ramme skovlen, da det binder sig fast til farsen på skovlen)
- 3) Først kører mixer på lav indstilling (1) i 1 min, så suspensionen absorberes i farsen
- 4) Kør mixer på indstilling 3 i 1 min
- 5) Sluk mixer, og løft skovlen ud af skålen, tag skålen forsigtigt væk, så den fars, der sidder fast på skovlen, ikke falder af
- 6) Start med at skrabe rundt i bunden af skålen, så det sikres, at farsen i bunden hvirvles med op i resten. Derefter nedskrabs kanterne, og til sidst fyldes farsen fra skovlen ned i skålen
- 7) Til sidst køres farsen på indstilling 2 i 1 min

Hvis varmebehandling ikke sker straks, skal farsen placeres på køl (2°C) for at minimere risiko for, at sporene spirer og dermed går tabt under opvarmningen.

Røreskålen renskrabes og rengøres med våde servietter efter hver serie. Røreskålen, som nu fremstår helt ren, afsprittes inden næste kørsel.

Pølsestopning

60 mm steril plastiktarm klippes i ca. 140 cm længde for at sikre, at snorklerne er lange nok til at stikke op over vandet.

Tarmene lægges i varmt vand inden fyldning, indtil de er blødgjorte.

- Loggerne spændes i loggerholderne ved at sikre, at løsneskruen er løsnet, så skruen flugter med holderen ved hjælp af en unbrakonøgle (4 mm).
- Derefter stikkes loggeren ind igennem røret på holderen, så loggeren stikker ca. 2 cm ud fra holderen.
- Lukkeskruen spændes (den centrerede skrue) forsigtigt med unbrakonøglen, og loggeren sidder nu fast.
- Loggerholderen med logger føres ca. 35 cm ind igennem tarmens ene ende, og tarmen lukkes ved at spænde en strip rundt om røret i loggerholderen lige bag ved den runde skive.
- Snorkelpølsen påsættes pølsefylderen, og loggerholderen sættes ind i røret på pølsefylderen, så farsen flyder omkring den, og det sikres, at loggeren sidder centreret i pølsen.
- Pølsen stoppes, indtil den når 48-52 cm (ikke længere, for så kan de ikke være i isbadet), og derefter lukkes pølsen med en strip (stripenderne kan evt. klippes af).

Denne proces gentages ved alle snorkelpølser.

Derudover fyldes 4 poser pr. serie med fars, lukkes med vakuum. Dette er steril-kontroller, som lægges i vandbadet sammen med pølserne og dermed får samme varmebehandling (inkl. opvarmning og holdetid), som pølserne.

Varmebehandling

Snorkelpølserne placeres i snorkelpølsestativet, så alle ender med loggere vender den samme vej.



- Loggerstikkene sættes i loggeren, og knappen holdes nede i 3 sek., indtil der står "REC" på skærmen.
- Stativet nedsænkes i vandet.
- Den 4. logger (den, der ikke er bundet i fars) nedsættes i vandbadet uden at ramme kanterne af vandbadet og pølserne samt stativet.
- Opvarmningen følges løbende.

Forventet tid til 72°C kernetemperatur er ca. 45 min.

Vandbadet indstilles til 75°C. Pølserne placeres i stativ i vandbad og opvarmes til 72°C i centrum med 10 min. holdetid (minutur fra Lab M startes, når centrumtemperatur på 72°C er nået).

Når holdetid ved 72°C er gået, tages stativet op.

Pølserne kan evt. tages ud af holderen for at frigive holderen til næste varmebehandling. Det er vigtigt, at serierne er mærket op, så det sikres, at koderne senere kan identificeres.

Efter 1 time på is sættes pølserne på køl (2°C) natten over.

Slicening og pakning

Steril håndtering af pølsekiverne i LAF-bænk:

Pølserne afsprittes med 70% ethanol med en gazeclud og placeres i cleanbænk på afsprittet skærebræt overtrukket med vrangvendt steril pose. Ved al håndtering bæres engangshandsker.

I lafbænk peeles pølserne og skæres i skiver af 1 cm.

Skiverne pakkes i enten MAP eller i vakuum. Der pakkes i ilttætte poser (PETP 12/PEP LLDPE 75).

Skiver til gaspakning pakkes i 30% CO₂/70% N₂ (± 2% udsving er ok. Hvis CO₂% kommer under 28%, slukkes og tændes der for gaspakker). Skiverne lægges i bakke (Multiline LINE delikatessebæger, 108 x 81, 26 PP klar) og derefter i pose. Gassammensætning måles ved **start og slut** af pakning.

Skiverne til vakuumpakning lægges midt i posen og vakuumeres sådan, da det er nemmere at se, om der dannes luft under lagring, når de ligger sådan.

Følgende indstillinger anvendes ved pakning:

Vakuumeringsgrad: 5 mbar
Efterfyldningsgrad: 550 mbar
Svejsning: 2,0