



HÖGSKOLAN I BORÅS
INSTITUTIONEN INGENJÖRSHÖGSKOLAN

**Validering av prognosmodeller för prediktering av
tillväxt för mjölksyrabakterier i rökt skinka**

**Validation of predictive models to predict the
growth of lactic acid bacteria in cured ham**

Needa Shaheen
Lina Sauer

Validering av prognosmodeller för prediktering av tillväxt för mjölksyrabakterier i rökt skinka

Validation of predictive models to predict the growth of lactic acid bacteria in cured ham

NEEDA SHAHEEN, S119217@student.hb.se

LINA SAUER, S118112@student.hb.se

Examensarbete, 15 hp

Ämneskategori: Teknik

Högskolan i Borås
Institutionen Ingenjörshögskolan
501 90 BORÅS
Telefon 033-435 4640

Examinator: Elisabeth Feuk-Lagerstedt

Handledare, namn: Klara Båth
 Marie Blomqvist

Handledare, adress: SP – Food and Bioscience (SIK-Institutet för Livsmedel och
 Bioteknik)
 402 29 Göteborg

Uppdragsgivare: SP – Food and Bioscience (tidigare SIK – institutet för livsmedel och
 bioteknik), mikrobiologi och processhygien, Göteborg

Datum: 2015-01-23

Nyckelord: Förskämning, skinka, prognosmikrobiologi, mjölksyrabakterier,
 identifiering, hållbarhetstid, lagringstemperatur

Förord

Detta examensarbete omfattar 15 högskolepoäng och utfördes på SP-Food and Bioscience (tidigare SIK-Institutet för Livsmedel och Bioteknik) i Göteborg under perioden november 2014 till januari 2015.

Vi vill tacka vår examinator på Högskolan i Borås, Elisabeth Feuk-Lagerstedt för all hjälp och vägledning.

Vi skulle vilja tacka alla medarbetare på avdelningen för mikrobiologi och processhygien på SP-Food and Bioscience för att vi har fått möjligheten att utföra vårt examensarbete hos dem.

Vi vill tacka våra handledare Klara Båth för vägledning genom hela examensarbetet och Marie Blomqvist för handledning genom laborativt arbete.

Vi vill tacka Lisbeth Märs och Ingela Karlsson för handledning och hjälp vid laborativt arbete.

Vi vill även ge ett stort tack till Pernilla Arinder för all hjälp med analyserandet av resultat och vägledning genom rapportskrivandet.

Sammanfattning

Examensarbetet utfördes på SP-Food and Bioscience (tidigare SIK-Institutet för Livsmedel och Bioteknik) och anknyter till projektet DynahMat (Dynamisk Hållbarhetsdatum för Minimerat Svinn). Syftet med examensarbetet var att undersöka hur väl tillväxten av mjölksyrabakterier predikteras av tre befintliga prognosmodeller jämfört med tillväxten av naturligt förekommande mjölksyrabakterier i MA-packad rökt skinka.

Tillväxten av mjölksyrabakterier i rökt MA-packad skinka studerades vid tre lagringstemperaturer (4, 8 respektive 12 °C) och resultat visade att förskämningen av den rökta skinkan skedde snabbare vid en högre lagringstemperatur. De befintliga prognosmodellerna som tillämpades var modeller framtagna av Kreyenschmidt et al. (2010), Mataragas et al. (2006) och Devlieghere et al. (1998,1999). Prognosmodellerna validerades genom beräkning av accuracy- och bias faktor och resultaten visade att de tre modellerna var tillämpbara för att prediktera tillväxten av mjölksyrabakterier.

De olika arterna av mjölksyrabakterier i den rökta skinkan identifierades vid slutet av lagringstiden och identifieringen visade att de dominerande arterna av mjölksyrabakterier var *Lactobacillus curvatus* vid 4 °C och *Lactobacillus sakei* vid 8 respektive 12 °C.

Laborativa studier har även utförts på skinkan där *Listeria monocytogenes* ympades in i produkten för att undersöka dess tillväxthastighet under påverkan av mjölksyrabakteriernas tillväxt. Tillväxten av *L. monocytogenes* var låg i belastningsstudien vilket troligen berodde på tillväxt av mjölksyrabakterier som antingen bildade bakteriociner eller att de två mikroorganismerna konkurrerade om näringen i skinkan. Beräkning av tillväxt för *L. monocytogenes* med hjälp av FSSP visade att tillväxten påverkades av förekomsten av mjölksyrabakterier.

Nyckelord: Förskämning, skinka, prognosmikrobiologi, mjölksyrabakterier, identifiering, hållbarhetstid, lagringstemperatur.

Abstract

The bachelor thesis was performed at SP-Food and Bioscience (formerly SIK-Institutet för Livsmedel och Bioteknik) as part of the project DynahMat (Dynamisk Hållbarhetsdatum för Minimerat Svinn). The purpose of the study was to examine how the growth of LAB (lactic acid bacteria) was predicted by three predicative models compared to the microbial growth of LAB in naturally contaminated MA-packed cured ham.

The growth of LAB in the cured ham was studied at three storage temperatures (4, 8 and 12 °C) and results showed that the spoilage of ham occurred faster at higher temperatures. The three predicative models that were used were models developed by Kreyenschmidt et al. (2010), Mataragas et al. (2006) and Devlieghere et al. (1998, 1999). The predictive models were validated by calculating accuracy and bias factors and the results showed that the models were applicable for predicting the growth of LAB.

The different species of LAB in the cured ham was identified at the end of the storage time and the identification showed that the dominant species of LAB were *Lactobacillus curvatus* at 4 °C and *Lactobacillus sakei* at 8 and 12 °C.

Experiment where *L. monocytogenes* was inoculated into the product was performed to examine its growth under the influence of LAB. The growth rate of *L. monocytogenes* was slow and that probably depended on the production of bacteriocins by LAB or competition for nutrients. The growth of *L. monocytogenes* was calculated with the FSSP and the results showed that the growth was affected by the presence of LAB.

Innehåll

1. Inledning	1
1.1 Bakgrund	3
1.1.1 Förskämningsprocessen	3
1.1.2 Prognosmodeller	4
1.1.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	4
1.2 Syfte	5
1.3 Avgränsning	5
2. Teori.....	6
2.1 Prognosmodeller	6
2.1.1 Kreyenschmidt et al. (2010)	6
2.1.2 Mataragas et al. (2006)	7
2.1.3 Devlieghere et al. (1998,1999)	8
2.2 FSSP.....	10
2.3 Statistisk analys och validering av modeller	11
2.3.1 Bias- och accuracy faktor	11
3. Material och metodbeskrivning	12
3.1 Material	12
3.1.1 Produkt.....	12
3.1.2 Instrument	12
3.1.3 Kemikalier	13
3.1.4 Mikroorganismer	13
3.2 Förberedelser av medium, odlingsplattor och spädningsvätskor	14
3.2.1 MRS agar (De Man, Ragosa, Sharpe)	14
3.2.2 Peptonvatten (PW).....	14
3.2.3 Buffrat peptonvatten	15
3.3 Lagringsstudier vid 4, 8 respektive 12 °C	16
3.3.1 Provuttag och odling	16
3.3.2 Kontroll av pH	16
3.3.3 Kontroll av temperatur.....	17
3.3.4 Kontroll av vattenaktiviteten i produkten	17
3.3.5 Sensorisk analys.....	17
3.4 PCR och sekvensering	18
3.4.1 Provberedning	18
3.4.2 PCR-mix	18
3.4.3 PCR program	18
3.4.4 Detektion av PCR produkt.....	19
3.4.5 Sekvensering och identifiering	19
3.5 Ympning av <i>Listeria monocytogenes</i> i charkprodukten.....	20
3.5.1 Tillverkning av nya förpackningar	20
3.5.2 Köldanpassning av <i>Listeria monocytogenes</i>	20
3.5.3 Packning av produkt och ympning av <i>Listeria monocytogenes</i> i produkt.....	20
3.5.4 Provuttag och odling	21
3.5.5 FSSP (Food Spoilage and Safety Predictor).....	21
4. Matematiska beräkningar och hantering av resultat	22
4.1.1 Halt av mjölksyrabakterier (CFU/g).....	22
4.1.2 Bestämning av den initiala halten av mjölksyrabakterier	22
4.1.3 pH	22
4.1.4 Temperaturloggar	22

4.1.5	Bestämning av den specifika maximala tillväxthastigheten (μ_{\max})	23
4.1.6	Standardavvikelse	23
4.1.7	R-kvadratvärde (R^2).....	23
5.	Resultat och diskussion.....	24
5.1	Lagringsstudier vid 4, 8 respektive 12 °C	24
5.1.1	Tillväxtkurva för lagringsstudier och bestämning av den initiala halten av den förskämmande mikroorganismen	24
5.1.2	pH	27
5.1.3	Temperatur.....	28
5.1.4	Kreyenschmidt et al. (2010)	29
5.1.5	Mataragas et al. (2006)	31
5.1.6	Devlieghere et al. (1998, 1999)	33
5.1.7	Bias – och accuracy factor för modeller	35
5.1.8	Slutsats och diskussion för jämförelse av tillväxtkurvor med prediktiva modeller 35	
5.2	Identifiering av de olika arterna av mjölksyrabakterier i skinkan.....	37
5.3	Tillväxt av <i>Listeria monocytogenes</i> i charkprodukten	38
5.3.1	Tillväxtkurva för mjölksyrabakterier och <i>L. monocytogenes</i>	38
5.3.2	FSSP	40
6.	Slutsats.....	42
	Referenser	43
Bilaga 1	FSSP – parametrar för mjölksyrabakterier och <i>L. monocytogenes</i>	
Bilaga 2	FSSP – parametrar för <i>L. monocytogenes</i>	

1. Inledning

Matsvinn förekommer i hela livsmedelskedjan och är ett stort problem både ur en ekonomisk synvinkel samt ur ett miljöperspektiv. Detta är för att mat som fortfarande är ätbar kastas, vilket är onödigt slöseri av nödvändiga resurser (Livsmedelsverket, 2013). En studie som utfördes på mängden matavfall för hela livsmedelskedjan i Sverige år 2012 visade att det uppkommer cirka 1,2 miljoner ton matavfall per år (Livsmedelsverket, 2014b). En svensk studie visade att en tredjedel av matavfallet som slängs är på grund av felaktig märkning av hållbarhetsdatumet på livsmedelsprodukter (Livsmedelsverket, 2014b).

Det angivna bäst-före-datumet anges oftast av tillverkaren och är endast en garanterad kvalitetstid av produkten, d.v.s. sista dagen då produkten kan förbrukas. Efter datumet har passerats är det upp till konsumenterna själva att avgöra om produkten är hållbar. Konsumenter förlitar sig oftast på det angivna bäst-före-datumet, vilket leder till att livsmedel som fortfarande är användbara efter angiven hållbarhetstid går till spillo (Naturvårdsverket, 2014). Huruvida ett livsmedel är hållbart efter dess bäst-före-datum har passerat beror på många parametrar och på vilket livsmedel det är. De olika parametrarna som påverkar kvalitén hos kylda livsmedel är t.ex. processhygien, förpackning och förvaringstemperatur, där temperaturen är den viktigaste parametern. Om den aktuella förvaringstemperaturen för produkten hålls under hela kylkedjan kan dess hållbarhet förlängas (FAO, 2013).

En annan parameter som har stor betydelse för tiden till förskämningen är den ursprungliga mikrobiologiska kvalitén av produkten före lagring, det vill säga den initiala halten av den förskämmande mikroorganismen. Den initiala halten är viktig på grund av att den anger mängden av förskämningsfloran som finns i produkten från början och baserat på dess halt kommer förskämningsprocessen under påverkan av temperatur ske under en vis tid (Extension, u.å.).

DynahMat (Dynamisk Hållbarhetsdatum för Minimerat Svinn) är ett treårigt Vinnova-finansierat projekt som drivs av Lunds universitet tillsammans med SP-Food and Bioscience (tidigare SIK-Institutet för Livsmedel och Bioteknik) och Malmö högskola för att minska matsvinn, öka kvalitén och produktsäkerheten hos kylda livsmedel. I detta projekt skall ett dynamiskt hållbarhetsdatum för produkterna tas fram genom att utveckla sensorer som genom tekniska lösningar kopplas samman med framtagna prognosmodeller. Dessa sensorer kommer att placeras i kylda livsmedelsförpackningar i form utav elektroniska chip och kommer därmed att kunna känna av förändringar av temperatur över tid och prediktera den mikrobiella tillväxten (DynahMat, 2013). Detta medför att hållbarhetsdatumet kan variera och förlängas eller förkortas och blir därmed dynamisk och mer pålitlig vilket kan leda till minskat matsvinn. De elektroniska chipen kommer att vara kopplade till en databas och kommer därmed att kunna sända information vidare till exempelvis mobiltelefonen, vilket gör att konsumenterna sedan kan avgöra om varan är ätbar eller inte (DynahMat, 2014). SP-Food and Bioscience fördjupar sig inom förskämning och säkerhet av livsmedelsprodukter genom att använda sig av prognosmikrobiologi inom detta projekt, vilket innebär att hållbarhetstiden bestäms utifrån bakteriehalten vid olika tidpunkter som beror på temperaturen längs hela livsmedelskedjan. Prognosmikrobiologi är ett forskningsområde inom livsmedelsmikrobiologi där man tillämpar matematiska modeller för att kunna prediktera den mikrobiella florans beteende i livsmedlet (Valero et al., 2013).

I projektet, DynahMat, studeras tre kylda livsmedelsprodukter: färsk fisk packad i modifierad atmosfär (MA-packad), cottage cheese och rökt MA-packad skinka. I detta examensarbete utförs studier för att validera prognosmodeller för den rökta skinkan (Pärssons rökta skinka från Scan), där förskämningen av charkprodukten studeras.

1.1 Bakgrund

1.1.1 Förskämningprocessen

Förskämning är den process då livsmedel bryts ner och får förändrade egenskaper som begränsar dess hållbarhetstid. Förskämning av livsmedel innebär inte nödvändigtvis att det blir hälsofarligt utan de förändrade egenskaperna av livsmedlet kan vara ändring i smak, lukt och konsistens, vilket gör att de inte längre är godtagbara. De förändrade egenskaperna av livsmedlet orsakas vanligtvis av att halten av den förskämmande mikroorganismen har nått en maximal acceptansnivå (Kreyenschmidt et al., 2010). När mikroorganismer förskämmer livsmedel så använder de detta som substrat, bryter ner det och bildar metaboliter som gör att livsmedlet luktar och/eller smakar illa. Hur lång tid det tar för olika livsmedel att förskämmas beror bl.a. på vilka mikroorganismer som förekommer och kan växa i det specifika livsmedlet. Vilken eller vilka mikroorganismer som förskämmer livsmedlet beror på ett antal inre faktorer i produkten som t.ex. pH, vattenaktivitet, tillsatta konserveringsmedel och mikrobiologisk kvalitet, samt yttre faktorer så som lagringstemperatur och förpackningsatmosfär. Oftast är det en specifik mikroorganism som dominerar förskämningprocessen (Livsmedelsverket, 2014b). Vattenaktivitet är ett mått på hur mycket tillgängligt vatten det finns i produkten och för mikrobiell tillväxt av de flesta bakterier krävs en vattenaktivitet på $> 0,9$ (Aqua Lab, 2015).

Förskämningsoorganismer som är känt förekommande i kokt och rökt skinka är mjölksyrabakterier, jäst, *Pseudomonas spp.*, *Enterobacteriaceae*, och *Brochothrix thermophacta* (Kreyenschmidt et al., 2010; Borch et al., 1996). Enligt tidigare studier så är det oftast mjölksyrabakterierna som är den dominanta förskämmande mikroorganismen för MA-packad skinka. Detta beror på gassammansättningen i förpackningen (70 % N_2 och 30 % CO_2) där den mikrobiella tillväxten hämmas på grund av bristen på O_2 samt den antimikrobiella effekten av CO_2 . Även ingredienser i produkten som t.ex. nitrit och salt påverkar den mikrobiella tillväxten. Mjölksyrabakterierna påverkas inte av de faktorerna i samma utsträckning som övriga initialt förekommande mikroorganismer i produkten på grund av att de inte kräver aeroba förhållanden för tillväxt och är relativt toleranta mot ovan nämnda ingredienser. Detta medför att de övriga mikroorganismerna inte påverkar förskämningprocessen avsevärt och behöver därför inte studeras i detta sammanhang (Egan, 1983; Samelis et al., 2000).

Mjölksyrabakterierna som har en förmåga att förskämma köttprodukter vid låga temperaturer är psykrotrofer och psykrotrof är ett samlingsnamn för organismer som är toleranta mot kyla. Detta innebär att mikrobiell tillväxt av bakterierna kan ske även vid kylskåpstemperaturer. (Livsmedelsverket, 2014b; Kraft, 1992). En maximal acceptansnivå av mjölksyrabakterier är en halt på över 7 log CFU/g för kokt MA-packad skinka och både en minskning i pH och sensoriska förändringar kan då detekteras. pH-sänkningen beror på mjölksyrabakteriernas metaboliska produkt vilket är mjölksyra (Vaikousi et al., 2008; Kreyenschmidt et al., 2010). De sensoriska förändringarna av kylda livsmedel beror på vilken art det är av den förskämmande mikroorganismen i produkten. Vanligt förekommande förskämmande arter av mjölksyrabakterier i MA-packad kokt skinka är *Lactobacillus sakei* och *Lactobacillus curvatus* (Samelis et al., 2000; Hu et al., 2009), där *L. sakei* orsakar slembildning och färgförändring i produkten (Devlieghere et al., 2001; Borch et al., 1996).

1.1.2 Prognosmodeller

Det finns många befintliga prognosmodeller som kan tillämpas för att prediktera ett bäst – före – datum för livsmedel baserat på den mikrobiella tillväxten i produkten. En modell som har utvecklats av Kreyenschmidt et al. (2010) för att kunna förutse hållbarhetstiden för MA-packad kokt skinka i de olika stegen i kylkedjan för produkten består av primära – och sekundära modeller som har kombinerats. Primära modellen beskriver tillväxten av de förskämmande mikroorganismerna under lagringstiden och de sekundära modellerna beskriver temperaturens effekt på tillväxten. I modellen framgick det att temperaturen är en väldigt viktig parameter som påverkar tillväxten av mikroorganismer i livsmedel. Om temperaturen ökas så ökar mikroorganismernas tillväxthastighet och därmed sker förskämningen av produkten snabbare (Kreyenschmidt et al., 2010).

En annan prognosmodell som har utvecklats av Mataragas et al. (2006) för att prediktera den mikrobiella tillväxten fungerar på samma sätt som modellen framtagen av Kreyenschmidt et al. (2010). Den har utvecklats genom studier av rökt vakuumpförpackad köttprodukt och även här studeras det hur tillväxten av den förskämmande mikroorganismen påverkas av temperaturen under lagringstiden (Mataragas et al., 2006). En annan studie utfördes där en prognosmodell utvecklades av Devlieghere et al. (1998, 1999) genom att utföra experiment i buljong där det undersöktes hur tillväxthastigheten av den förskämmande mikroorganismen påverkades av varierande koncentrationer av koldioxid i produktens vattenfas samt vattenaktiviteten i produkten (Devlieghere et al., 1998; Devlieghere et al., 1999).

1.1.3 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes är en patogen mikroorganism som förekommer fritt i naturen och som på olika sätt kan komma in i anläggningar där livsmedel produceras. Bakterien är tålig och kan bl.a. tillväxa i livsmedel som är vakuumpförpackade samt produkter som är packade i en modifierad atmosfär. Den klarar även av att växa i kylskåpstemperatur och den inhiberas inte av de salthalter som oftast förekommer i charkprodukter. *L. monocytogenes* kan förekomma i många livsmedel, men dör vid upphettning (över 70 °C) av livsmedlet. Produkter som förtärs utan att upphettas är t.ex. charkprodukter (t.ex. kokt – och rökt skinka), dessertostar och gravad fisk (Livsmedelsverket, 2014a) och om produkterna är kontaminerade av *L. monocytogenes* kan personer med nedsatt immunförsvar få listeriainfektion (Livsmedelsverket, 2014a).

Det finns olika studier om hur tillväxten av mjölksyrabakterier och *L. monocytogenes* påverkas av varandra. En del arter av mjölksyrabakterier kan hämma tillväxten av *L. monocytogenes* genom att de producerar antimikrobiella metaboliter, så kallade bakteriociner. De kan även hämma tillväxten av patogenen på grund av att de två mikroorganismerna tävlar om näring. Både *L. sakei* och *L. curvatus*, som nämndes tidigare som de vanligaste förekommande förskämmande arterna av mjölksyrabakterier i MA-packade kokt skinka, har tillämpats i studier för att undersöka om de kan producera bakteriociner för att hämma *L. monocytogenes* (Devlieghere et al., 2001; de Souza Barbosa et al., 2015; UniProt, 2014).

1.2 Syfte

Examensarbetets syfte var att studera förskämningen under lagringstiden för Pärssons rökta MA-packade gourmetskinka från Scan vid olika lagrings temperaturer, +4,+8 respektive +12 °C, för att se hur den mikrobiella tillväxten påverkades av temperaturen. Tillväxtkurvor konstruerades för halten mjölksyrabakterier och dess initiala halt, medelvärde och spridning i charkprodukten bestämdes. Resultaten användes sedan för att validera befintliga prognosmodeller och de olika arterna av mjölksyrabakterier som fanns i produkten vid hållbarhetstidens slut identifierades. Även försök där *L. monocytogenes* ympades in i charkprodukten utfördes för att bestämma dess tillväxthastighet i produkten.

1.3 Avgränsning

Detta examensarbets avgränsning var att validera tre befintliga prognosmodeller för tillväxten av mjölksyrabakterier i förhållande till Pärssons rökta MA-packade skinka från Scan.

2. Teori

2.1 Prognosmodeller

I detta examensarbete validerades tre utvalda befintliga prognosmodeller mot resultat från laborativa studier av den rökta MA-packade skinkan från Scan.

2.1.1 Kreyenschmidt et al. (2010)

En modell utvecklades av Kreyenschmidt et al. (2010) i syfte att bestämma hållbarhetstiden av MA-packad kokt skivad skinka i de olika stegen av kylkedjan. Modellen utvecklades genom lagringsstudier av skinkan under förvaring vid konstanta temperaturer (2 – 15 °C). Under lagringsstudierna undersöktes mjölksyrabakteriernas tillväxt, TVC (total viable count), sensoriska förändringar (smak, lukt och konsistens av skinkan) och förändringar i pH. Olika primära – och sekundära modeller kombinerades för att hitta en lämplig modell som stämde överens med resultaten från lagringsstudierna. Genom att utföra statistiska analyser erhöles pålitligast resultat då den primära modellen The modified Logistic model och den sekundära modellen Arrheniusekvationen kombinerades.

Primär modell - The modified Logistic model

$$N(t) = A + \frac{C}{1 + e^{-B \cdot (t-M)}} \quad (\text{Ekv. 2.1})$$

Där:

t = tid

N = \log_{10} CFU/g vid tiden t

$C = N_{\max}$ = maximal mikrobiell tillväxt (CFU/g)

M = tiden då maximal tillväxthastighet har uppnåtts (t)

B = den relativa maximala tillväxthastigheten vid tiden M (h^{-1})

Sekundär modell - Arrheniusekvation

$$\ln(B) = \ln F - \left(\frac{E_a}{R \times T} \right) \quad (\text{Ekv. 2.2})$$

Där:

B = den relativa maximala tillväxthastigheten vid tiden M

F = pre-exponential factors (h^{-1})

E_a = aktiveringsenergi för bakteriell tillväxt (kJ mol^{-1})

R = gaskonstanten ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T = absoluta temperaturen (K)

2.1.2 Mataragas et al. (2006)

En prognosmodell utvecklades av Mataragas et al. (2006) för att kunna förutspå hållbarhetstiden för köttprodukter både snabbt och pålitligt. Laborativa experiment utfördes på en naturligt kontaminerad vakuumpackad rökt skivad köttprodukt. Detta medförde att parametrar som kunde leda till förutsägbara fel som t.ex. produktens struktur/sammansättning och mikrobiell tävling räknas med. Modellen validerades under dynamiska temperaturer som oftast bemöts i hela kylkedjan och i andra kött produkter, detta för att kunna uppskatta modellens tillämplighet på liknande produkter. Slutet av hållbarhetstiden för produkten uppskattades genom visuell inspektion där förändring i färg, bildning av slem, sur lukt, minskning i pH, hög halt av den förskämmande mikroorganismen och/eller mätning av koncentrationen av dess metaboliska produkt undersöktes. Olika modeller tillämpades och genom statistiska analyser konstaterades det att en kombination av Modified Gompertz function (primär modell) respektive Arrheniusekvation (sekundär modell) gav pålitligast resultat. Den prediktiva framtagna modellen var tillämpbar inom följande experimentella riktlinjer för produkten;

- Initial halt av den förskämmande mikroorganismen = 0,5 – 1,5 (log CFU/g)
- Vattenaktivitet, $a_w = 0,977 - 0,983$
- NaCl (salthalt) = 2,0 %
- pH = 6,26–6,48
- Förvarings temperatur = 0-12 °C

Primär modell - Modified Gompertz function

$$N(t) = A + C \times \exp\{-\exp[-B \times (t - M)]\} \quad (\text{Ekv. 2.3})$$

$$\mu_{max} = \frac{B \times C}{e} \quad (\text{Ekv. 2.4})$$

$$LDP = M - \frac{1}{B} \quad (\text{Ekv. 2.5})$$

$$N_{max} = A + C \quad (\text{Ekv. 2.6})$$

Där:

$N(t)$ = \log_{10} CFU/g vid tiden t

A = den initiala halten, N_0 (log CFU/g)

C = maximala halten minus den initiala halten = $N_{max} - N_0$ (log CFU/g)

B = den maximala tillväxthastigheten (d^{-1}) vid tiden M

M = tiden vid den maximala tillväxthastigheten (d)

$e = 2,7182$

LDP = lag phase duration

Sekundär modell - Arrheniusekvation

$$\ln \mu_{\max} = \ln A_{\mu} - \left(\frac{E_a}{R \times T} \right) \quad (\text{Ekv. 2.7})$$

$$\ln \left(\frac{1}{\text{LPD}} \right) = \ln A_{\text{LPD}} - \left(\frac{E_a}{R \times T} \right) \quad (\text{Ekv. 2.8})$$

Där:

A_{μ} och A_{LPD} = pre-exponential factors

E_a = aktiveringsenergi för mikrobiell tillväxt (kJ/mol)

R = gaskonstanten (8,314 J/mol K)

T = temperatur (K)

2.1.3 Devlieghere et al. (1998,1999)

Den viktigaste komponenten i MA-packade livsmedel är koldioxidhalten i gassammansättningen på grund av dess antimikrobiella effekt. Devlieghere et al. (1998) studerade de olika parametrarna som påverkar hur mycket koldioxid som upplöstes i vattenfasen av produkten. De parametrar som hade störst effekt var den initiala halten av koldioxid i gasfasen, förhållandet mellan gas- och produktvolym (G/P) samt pH. Response Surface Model framtagen av Devlieghere et al. (1998) predikterar mängden koldioxid upplöst i modifierad BHI-buljong genom medelvärden framtagna med Response Surface Methodology (RSM). I modellen räknas parametrarna G/P, initial koldioxid koncentration i gasfasen och temperaturen in. Koncentrationen av koldioxid i lösningen vid jämvikt beskrivs vanligtvis med Henrys lag, denna utvecklades vidare genom att andra parametrar tilldelades och följande ekvation härleddes.

$$(\text{CO}_2)_{\text{aq}}^E = \frac{\left(\frac{G}{P} \times \rho_{\text{CO}_2} + K \right) - \sqrt{\left(\left(\frac{G}{P} \times \rho_{\text{CO}_2} + K \right)^2 - 4 \cdot K \cdot \frac{G}{P} \cdot \% \text{CO}_{2g}^I \times \rho_{\text{CO}_2} / 100 \right)}}{2} \quad (\text{Ekv. 2.9})$$

Där:

$(\text{CO}_2)_{\text{aq}}^E$ = Koncentration av koldioxid i vattenfasen vid jämvikt (g/L)

K = Henrys konstant (g/L atm)

ρ_{CO_2} = Partialtrycket av koldioxid i gasfas vid jämvikt (atm)

G/P = Förhållandet mellan gas- och produktvolym

$\% \text{CO}_{2g}^I$ = Initial halt av koldioxid (%)

Ekvation 2.9 var tillämpbar för att bestämma hur de yttre - (temperatur, G/P och initial halt av koldioxid i gasfasen) och de inre (pH och fetthinnehåll) parametrarna påverkar lösligheten av koldioxid i produkten.

Devlieghere et al. (1999) jämförde tillväxten av *Lactobacillus sake* från experiment i buljong odlad i en modifierad atmosfär med Extended Ratkowsky Model och Response Surface Model. Response Surface Model gav generellt bättre resultat, men ologiska prediktioner erhöles av den maximala specifika tillväxthastigheten av *Lactobacillus sake* vid låga vattenaktiviteter. Extended Ratkowsky Model tillämpades för att se vattenaktivitetens- och temperaturens påverkan på den maximala specifika tillväxthastigheten av *Lactobacillus sake*. Även data tillsattes för att inkludera effekten av upplöst koldioxidhalt på lagfasen. Följande ekvation användes:

$$\mu_{max} = b (a_w - a_{w_{min}}) \times ([CO_{2_{max}}] - [CO_2]) - (T - T_{min})^2 \quad (\text{Ekv. 2.10})$$

Där:

μ_{max} = specifika maximal tillväxthastighet

$[CO_2]$ = koncentration av upplöst halt av koldioxid (ppm)

$[CO_{2_{max}}]$ = teoretiskt uppskattad maximal koncentration av upplöst halt av koldioxid (ppm)

b = konstant

T = temperatur (°C)

T_{min} = teoretisk uppskattad minsta temperatur för tillväxt av mikroorganismer (°C)

a_w = vattenaktivitet

$a_{w_{min}}$ = teoretisk uppskattad vattenaktivitet för tillväxt av mikroorganismer

Ovanstående ekvationer användes i modellen av Devlieghere et al. (1998, 1999) för att prediktera tillväxten av mjölksyrabakterier i Scans rökta skinka.

2.2 FSSP

Paw Dalgaard på DTU Food, en sektion inom Technical University of Denmark (DTU) har i samarbete med Brian J. Cowan på Anchor Lab K/S utvecklat programvaran FSSP som finns tillgänglig att ladda ner på: <http://fssp.food.dtu.dk/>. Programvaran är baserad på olika matematiska modeller som kan prediktera tillväxten av den förskämmande mikroorganismen samt tillväxten av patogener som förekommer i fisk- och köttprodukter. Prediktionen utförs utifrån hur temperaturen skulle kunna påverka lagringstiden för produkten och alternativt finns där prediktionen av tillväxten kan ske under konstanta- eller varierande lagringstemperaturer (DTU, 2014a).

I modellen för tillväxten av *L. monocytogenes* och mjölksyrabakterier samt för *L. monocytogenes* i produkt utan mjölksyrabakterier inkluderas olika parametrar som kan påverka tillväxten av mikroorganismerna. Modellen är tillämpbar för fisk- och köttprodukter som ligger inom riktlinjerna för följande parametrar (DTU, 2014a; DTU, 2014b):

- Förvarings temperatur: 2-25°C
- pH 5.6–7.7
- Nitrithalt i produkten: 0-150 ppm
- Rökkomponenter (fenol) i produkten: 0-20 ppm
- Halt av koldioxid i produktförpackningen: 0 – 100 %
- Halt av salt upplöst i vattenfasen av produkten: 0.7-9.0 %
- Organiska syror i vattenfasen av produkten: Ättiksyra = 0-11000 ppm, bensoesyra = 0-1800, citronsyra = 0 – 6500 ppm, diacetat = 0-3000 ppm, mjölksyra = 0-60000 ppm och sorbinsyra = 0-1300 ppm

FSSP innefattar ett antagande att mjölksyrabakterier hämmar/dämpar tillväxten av *L. monocytogenes*, en så kallad Jameson effekt. Denna effekt innebär att en art av mikroorganismerna producerar inhibitorer som hämmar tillväxten för en annan art (DTU, 2014b; Mellefont et al., 2008).

2.3 Statistisk analys och validering av modeller

2.3.1 Bias- och accuracy faktor

Validering av prognosmodeller görs genom att beräkna en bias – och accuracy faktor. Bias faktorn (B_f) indikerar medelskillnaden mellan de observerade - och predikterade värdena och ger en uppfattning om ifall modellen över – eller underpredikterar den mikrobiella tillväxten i produkten. Om $B_f < 1$ underpredikterar modellen tillväxten vilket är väldigt farligt då den mikrobiella tillväxten är högre i produkten än vad som anges av modellen. Om $B_f = 1$ ger modellen en perfekt bild av den mikrobiella tillväxten. En tillämpbar modell bör ha en biasfaktor mellan 0,75 och 1,25 (Ross, 1996; Dalgaard.P, 2000).

Accuracy faktor (A_f) anger hur korrekt modellen är, det vill säga hur nära de predikterade värdena är de observerade. Om faktorn = 1 så ger modellen en perfekt överensstämmelse mellan observerade – och predikterade värden. Ju högre värdet är över ett desto mindre stämmer modellen överens mellan de observerade – och predikterade värdena (Ross, 1996).

$$B_f = \text{Bias factor} = 10^{\left(\frac{\sum \log\left(\frac{\mu_{max,predicted}}{\mu_{max,observed}}\right)}{n} \right)} \quad (\text{Ekv. 2.11})$$

$$A_f = \text{Accuracy factor} = 10^{\left(\frac{\sum \left| \log\left(\frac{\mu_{max,predicted}}{\mu_{max,observed}}\right) \right|}{n} \right)} \quad (\text{Ekv. 2.12})$$

3. Material och metodbeskrivning

3.1 Material

3.1.1 Produkt

- Pärssons rökta gourmetskinka, MA-packad, Scan, Sverige

Innehållsförteckning:

”Skinka (skinkbitar 95 %), koksalt, antioxidationsmedel (E325, E301, E331), druvsocker, socker, stabiliseringsmedel (E452), konserveringsmedel (E250), rökarom.” (Pärssons, u.å.)

Signifikanta produktparametrar från Scan:

Nitrithalt = ca 150 ppm

Vattenaktivitet, (a_w) = 0,96

Salthalt = ca 3,0 %

Vattenhalt = 73-75 %

Gassammansättning i förpackning: 30 % CO₂ och 70 % N₂

3.1.2 Instrument

- Autoklav: 3170ELV, Tuttnauer, Nederländerna
- Stommackerpåsar: Blender bags standard 400, GRADE, England
- Homogeniseringsapparat: Smasher, AES Laboratore, Frankrike
- Våg: Delta dilutor, iUL-instruments, Spanien
- pH-meter: HI-8418, HANNA instruments, Italien
- Inkubator: Termaks AS, Norge
- Temperaturlogger: intab, Sverige
- Vattenaktivitetsapparat: AQUA LAB CX-2, USA
- Kastrull
- Kokplatta: Wilfa, Norge
- Centrifug: HERAEUS PICO 17, Thermo Scientific, Tyskland
- Eppendorf rör: SARSTEDT, Tyskland
- PCR rör: SARSTEDT, Tyskland
- PCR: MyCyclerTM Thermal cyclers, BIO-RAD, USA
- Elektrofores och tråg: Bio-Rad Laboratories, Inc, Singapore
- Packningsmaskin: Henkovic, HFE Vacuum Systems, Nederländerna
- Gasanalysapparat: CheckMate II, PBI Dansensor, Danmark
- Plast: utsida polyester, insida Polyethylene-EVOH (Ethylene Vinyl Alcohol), tjocklek 12 µm, Flextrus, Sverige
- Kula för gjutning av MRS agar plattor
- Kylväska

3.1.3 Kemikalier

- M.R.S agar (de Man, Ragosa, Sharpe): CM 361, Oxoid LTD., England
- Bacto™ Peptone: Difco 0118, BD (Becton, Dickinson and company), Frankrike
- NaCl, extra pure: Scharlau, Spanien
- MilliQ vatten
- Destillerat vatten
- Buffered peptone water: CM 509, Oxoid LTD., England
- iProof Mastermix: Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
- Primer F8: invitrogen™ life technologies, Sverige
- Primer 926R: invitrogen™ life technologies, Sverige
- Agaros: SIGMA-ALDRICH, USA
- Stege: Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
- 1x TAE-buffertlösning
- Loading buffer 5x: Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
- GelRed™: BIOTIUM, inc., USA
- BHI (Brain-Heart Infusion)-buljong
- AL-odlingsplattor: Bio-Rad Laboratories, Inc., Frankrike
- Blodagarplattor: Bakteriologiska laboratoriet Sahlgrenska, Sverige
- Buffertlösningar med pH 7,01 och 4,00 för kalibrering av pH-meter: Thermo Scientific, USA

3.1.4 Mikroorganismer

- *Lactobacillus plantarum* stam: ATCC 14917
- *Listeria monocytogenes* stam: 650: isolerad från korvmassa, 651: isolerad från fläskkött och 564: ”Scott A”, CCUG 32964 = ATCC 015313

3.2 Förberedelser av medium, odlingsplattor och spädningsvätskor

3.2.1 MRS agar (De Man, Ragosa, Sharpe)

Vid beredning av en liter lösning av MRS agar löstes 62 g M.R.S CM 361 agar i 1000 ml destillerat vatten under omrörning och upphettning (50 – 100 °C). Därefter sattes lösningen i vattenbad under minst 60 minuter för att sedan autoklaveras vid 121 °C under 15 minuter. Den autoklaverade lösningen fördelades i petriskålar med hjälp av en gjutningskula (figur 3.1) och fick stelna över natten i rumstemperatur och förvarades sedan i kylrum. Före användning utfördes sterilkontroll och odlingskontroll med *L. plantarum* på två av plattorna som inkuberades vid 30 °C i 72 h även pH kontrollerades på M.R.S agarn.

Gjutningskula för gjutning av odlingsplattor



Figur 3.1 Bild över gjutning av odlingsplattor med kula.

3.2.2 Peptonvatten (PW)

Peptonvatten användes som spädningsvätska vid homogenisering och spädning av prov (rökt MA-packad skinka från Scan). För en liter lösning av peptonvatten löstes ett gram av Bacto Pepton Difco 0118 och 8,5 g NaCl i 1000 ml Milli-Q vatten under omrörning. Lösningen autoklaverades vid 121 °C under 15 minuter och fick sedan svalna i rumstemperatur innan den förvarades i kylrum. Innan användning av peptonvattnet kontrollerades dess pH.

3.2.3 Buffrat peptonvatten

Vid homogenisering och spädning av prov där *L. monocytogenes* hade ympats in i produkten användes buffrat peptonvatten som spädningsvätska. För beredning av 1000 ml buffrat peptonvatten vägdes 20 g Buffrat pepton oxoid CM 509 och löstes i 1000 ml destillerat vatten. Lösningen autoklaverades därefter vid 121 °C under 15 minuter och sedan kontrollerades dess pH innan det förvarades i kylrum tills användning.

3.3 Lagringsstudier vid 4, 8 respektive 12 °C

Lagringsstudier har utförts på MA-packad rökt skinka från Scan vid tre olika lagringstemperaturer (4, 8 respektive 12 °C) och vid tre olika leveranser/omgångar (tabell 3.1). Det förutsattes att produkten hade förvarats vid en konstant temperatur på 4 °C från det att produkten var färdigtillverkad på Scan och under transport tills den levererats på SP-Food and Bioscience. Förpackningarna fördelades sedan slumpmässigt och förvarades vid olika konstanta lagringstemperaturer.

Tabell 3.1 Tabell över leverans av produkt.

Leverans /omgång	Lagrings-temperaturer (°C)	Leveransdatum	Lagringsdag (där lagringsdag noll är den dagen då skinkan hade paketerats på Scan)	Skivad och förpackad, förmiddag/eftermiddag	Förpackningsdag	Bäst-före-datum
1	4 °C och 8 °C	2014-11-11	1	Förmiddag	2014-11-10	2014-12-05
2	4 °C och 12 °C	2014-11-18	1	Förmiddag	2014-11-17	2014-12-12
3	8 °C och 12 °C	2014-11-25	2 (leveransen var försenad en dag)	Eftermiddag	2014-11-24	2014-12-19

3.3.1 Provvuttag och odling

Vid vardera provtagningstillfället användes tre förpackningar (A, B och C) från var temperatur och 10 g prov vägdes upp från varje förpackning i tre stommackerpåsar och späddes 1:10 med peptonvatten. Provet med peptonvatten homogeniserades i 60 s och fördelades på odlingsplattor med M.R.S agar med lämpliga spädningar. Proceduren upprepades på samma sätt för alla stommackerpåsarna med prov spädda 1:10. Odlingsplattorna inkuberades vid 30 °C i 72 h och sedan räknades halten bakterier för var odling.

3.3.2 Kontroll av pH

På lösningen av det homogeniserade provet med peptonvatten kontrollerades pH vid var temperatur och provtagning.

3.3.3 Kontroll av temperatur

I kylkubatorerna där provet förvarades kontrollerades och noterades temperaturen vid jämna tillfällen. Även temperaturloggar placerades i vardera kylkubatorn för mätning av temperatur.

3.3.4 Kontroll av vattenaktiviteten i produkten

Vattenaktiviteten av den rökta MA-packade skinkan kontrollerades vid början av odlingen och i slutet av odlingen, genom att använda sig av en vattenaktivitetsapparat. Apparaten kalibrerades först med destillerat vatten och prov fördelades sedan i provkoppar och vattenaktiviteten mättes.

3.3.5 Sensorisk analys

Vid varje provtagning för vardera paket undersöktes sensoriska parametrar såsom lukt, färg och konsistens av skinkan.

3.4 PCR och sekvensering

3.4.1 Provberedning

Från utvalda odlingsplattor vid de olika lagringstemperaturerna vid slutet av lagringstiden togs fem till sex slumpmässiga kolonier ut och slammades upp i Eppendorfrör med 500,0 µl autoklaverat MilliQ vatten. Ett hål gjordes i vardera locket och proven kokades i vattenbad under fem minuter. Proven centrifugerades under en minut i 10000xg och supernatanten överfördes till nya Eppendorfrör.

3.4.2 PCR-mix

En PCR-mix bereddades för att blanda med de uppslammade proven. Till ett prov behövdes 12,50 µl iProof Mastermix, 1,0 µl Primer F8, 1,0 µl Primer 926R och 8,50 µl MilliQ vatten. En provvolym på 2,0 µl och 23,0 µl PCR mix tillsattes till PCR rör och rören centrifugerades. En negativ kontroll bereddades i ett PCR rör där 23,0 µl PCR mix blandades med 2,0 µl MilliQ vatten.

3.4.3 PCR program

Proven analyseras genom PCR genom att använda ett 16S rRNA program (tabell 3.2).

Tabell 3.2 Tabell över cykler i 16S rRNA program för PCR.

Steg	Temperatur/tid	Cykler
1. Aktivering	98 °C, 10 minuter	x1
2. Denaturering	98 °C, 10 sekunder	x35
3. Annealing	55 °C, 30 sekunder	x35
4. Extension	72 °C, 1 minut	x35
5. Förlängd extension	72 °C, 10 minuter	x1
6. Kylning	4 °C, ∞	x1

3.4.4 Detektion av PCR produkt

PCR produkterna detekteras genom gelelektrofores på en 1,5 % agarosgel. En stor gel bereddes genom att 2,25 g agaros löstes upp i 150 ml 1x TAE buffertlösning under kokning. För beredning av en liten gel behövdes 0,75 g agaros och 50 ml 1x TAE buffertlösning. Gelen hölls upp i ett elektroforestråg och kammar sattes i och gelen fick stelna. En mikroliter av en loading buffer 5x som var blandad med GelRed™, en fluorescerande färg, blandades med 3,0 µl av PCR produkterna. Den stora gelen med PCR produkterna kördes i ca två timmar vid 80 V och den lilla gelen kunde köras vid 90 V i ca en timme.

3.4.5 Sekvensering och identifiering

PCR produkterna skickades till Macrogen Europe (Amsterdam, Nederländerna) för DNA-sekvensering. Resultatet från sekvenseringen analyserades sedan för att identifiera arten/arterna av den förskämmande mikroorganismen genom att använda Basic Local Alignment Search Tool, BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome#) mot databasen; 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea).

3.5 Ympning av *Listeria monocytogenes* i charkprodukten

I detta arbete utfördes laborativa studier där *L. monocytogenes* ympades in i den rökta MA-packade skinkan från Scan för att kunna studera tillväxten av mjölksyrabakterierna och *L. monocytogenes* och hur de påverkar varandras tillväxt.

3.5.1 Tillverkning av nya förpackningar

För att kunna ympa in *L. monocytogenes* i produkten paketerades den om och sammansättningen mellan gas och produkt beräknades för att kunna skapa en så lik miljö som möjligt som i ursprungsförpackningen. Totalvolymen av den ursprungliga förpackningen för produkten uppmättes till 690 ml varav 200 ml (1 g \approx 1 ml) bestod av produkten. Detta gav att 29 % av volymen var skinka och resterande var gas. I den nya förpackningen skulle volymen av produkten vara 40 ml vilket innebär att den totala volymen av förpackningen blev ungefär 138 ml.

3.5.2 Köldanpassning av *Listeria monocytogenes*

Tre stammar av *L. monocytogenes* ströks ut på tre blodagarplattor och inkuberades vid 35 °C i ett dygn. Övernattskulturer bereddes sedan av vardera stammen med BHI-buljong och inkuberades vid 37 °C. Spädningar utfördes för vardera övernattskulturen med peptonvatten för att nå en ymphalt på 1000 CFU/ml. De utspäda stammarna överfördes slutligen till BHI-buljong för att inkuberas vid 15 °C i tre dygn för att köldanpassas och kunna odlas vid 8 °C. Den slutgiltiga koncentrationen av vardera stammen blev 10⁹ CFU/ml.

3.5.3 Packning av produkt och ympning av *Listeria monocytogenes* i produkt

De tre stammarna av *L. monocytogenes* som hade köldanpassats i tre dygn vid 15 °C med en slutkoncentration på 10⁹ CFU/ml späddes till 10⁴ CFU/ml och blandades ihop. Tio förpackningar av den rökta MA-packade skinkan från Scan sönderdelades och blandades i en behållare och 40 g av produkten vägdes upp i vardera förpackning. Från lösningen med de tre mixade stammarna med en koncentration på 10⁴ CFU/ml fördelades 0,4 ml i vardera paket och blandades med produkten. Produkten packades sedan i en modifierad atmosfär; 30 % CO₂/70 % N₂ och gassammansättningen i de packade förpackningarna kontrollerades (ungefär 30 % CO₂/70 % N₂ och låg O₂ – halt). Lagringsstudien på den packade produkten med ympad *L. monocytogenes* utfördes sedan vid 8 °C.

Vid ompackning och ympning av skinkan så förvarades den så mycket som möjligt i kylväska för att minimera temperaturpåverkan.

3.5.4 *Provuttag och odling*

Ett prov på 20 g vägdes upp av produkten med ympad *L. monocytogenes* och spädes 1:10 med buffrat peptonvatten. Det späda provet homogeniserades i 60 sekunder och fördelades på odlingsplattor, AL – odlingsplattor för odling av *L. monocytogenes* och M.R.S odlingsplattor för mjölksyrabakterier, vid lämpliga spädningar. Odlingsplattorna inkuberades i två dygn vid 30 °C.

3.5.5 *FSSP (Food Spoilage and Safety Predictor)*

Predikterade tillväxtkurvor togs fram med programvaran FSSP version 4.0 för hur mjölksyrabakterier påverkar tillväxten av *L. monocytogenes* och hur tillväxten av *L. monocytogenes* utan inverkan av mjölksyrabakterier var. Parametrar som användes för att förutspå tillväxterna av mikroorganismerna presenteras i bilaga 1 respektive 2.

4. Matematiska beräkningar och hantering av resultat

4.1.1 Halt av mjölksyrabakterier (CFU/g)

Från vardera provtagningen vid de olika omgångarna och temperaturerna togs tre replikat ut från tre olika förpackningar (A, B och C) och späddes till lämpliga koncentrationer för odling. Log CFU/g i diagram vid de olika lagringsdagarna och temperaturerna baserades på ett medelvärde av resultaten (log CFU/g mjölksyrabakterier) från de olika odlingarna.

4.1.2 Bestämning av den initiala halten av mjölksyrabakterier

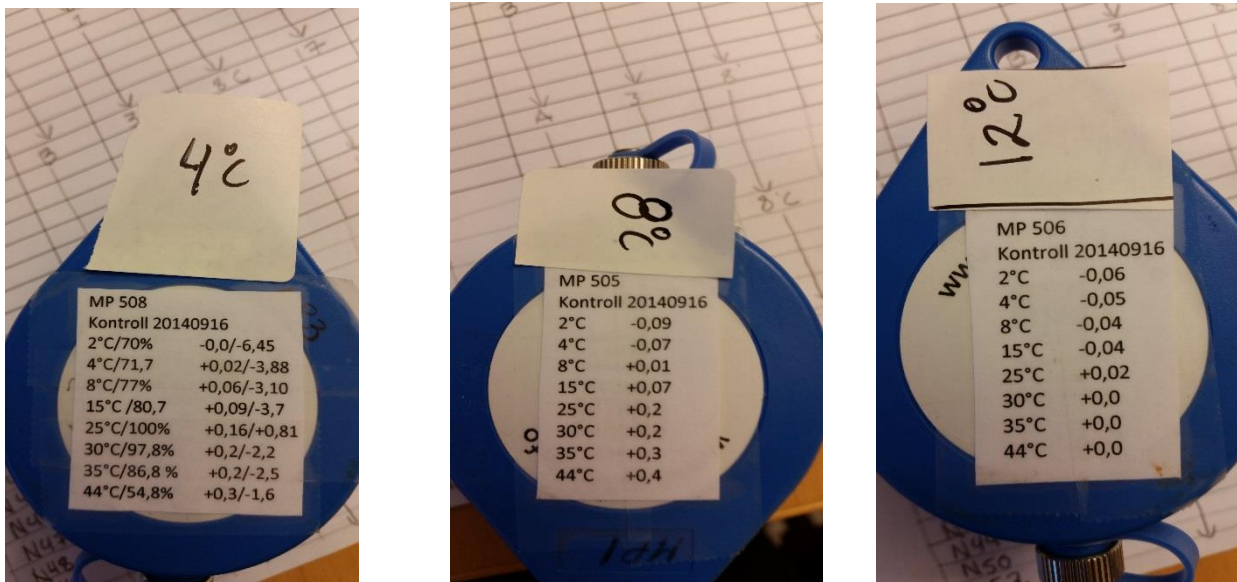
Bestämning av den initiala halten av mjölksyrabakterier gjordes genom att konstruera tillväxtkurvor för de olika lagringsomgångarna där medelvärdet av halten mjölksyrabakterier (log CFU/g) plottades mot lagringstiden i dagar. Då linjär regression gjordes gavs ett linjärt samband ($y = kx \pm m$) under den exponentiella fasen i tillväxtkurvan. Skärningspunkten (m) angav den initiala halten av mjölksyrabakterier vid dag noll. Den initiala halten som fås ur ekvationen från linjär regression togs ut under antagandet att det inte fanns någon lagfas.

4.1.3 pH

Vid varje provtagningstillfälle mättes pH på de tre homogeniserade replikaten (A, B och C). Resultaten av pH i diagrammen baserades på ett medelvärde av de tre replikaten.

4.1.4 Temperaturloggar

Fyra mätningar av temperatur utfördes per dag av loggarna och diagram över temperaturen i kylkubatorerna där skinkan förvarades baserades på ett medelvärde av dessa mätningar, där temperaturloggarna hade en korrektionsfaktor beroende på vilken temperatur den var inställd på (figur 4.1).



Figur 4.1 Figur över temperaturloggar och deras korrektionsfaktorer.

4.1.5 Bestämning av den specifika maximala tillväxthastigheten (μ_{max})

I denna studie bestämdes μ_{max} med hjälp av linjär regression av halten mjölksyrabakterier under lagringstiden. Punkter som motsvarade den exponentiella tillväxten valdes ut för att ta fram μ_{max} . Ur de konstruerade tillväxtkurvorna för lagringsstudier och modeller med linjär regression angav lutning (k) i ekvationen ($y = kx \pm m$) den specifika maximala tillväxthastigheten, μ_{max} (d^{-1}).

4.1.6 Standardavvikelse

De angivna standardavvikelserna i diagrammen baserades på medelvärden för tillväxten av mjölksyrabakterier (log CFU/g) från exponentiella fasen under lagringstiden. Standardavvikelsen är ett statistiskt mått på hur mycket de ingående värdena i populationen avviker från medelvärdet av dem och en uppfattning fås på hur liten/stor spridningen är av resultaten ifrån laborativa studier.

4.1.7 R-kvadratvärde (R^2)

R^2 anger hur beroende de ingående variablerna är av varandra i den linjära regressionen för diagrammen och värdet kan ligga mellan noll till ett. Ju närmre värdet är ett desto mer troligt är det att det finns ett linjärt samband mellan variablerna.

5. Resultat och diskussion

5.1 Lagringsstudier vid 4, 8 respektive 12 °C

5.1.1 Tillväxtkurva för lagringsstudier och bestämning av den initiala halten av den förskämmande mikroorganismen

Diagram 5.1 visade att temperaturen påverkade tillväxten av mjölksyrabakterier, till följd av att tillväxthastigheten ökade (Tabell 5.1), för lagringsstudier utförda på MA-packad rökt skinka från Scan. Diagrammet visade att lagringstiden för de omgångarna där den rökta skinkan lagrades vid 8 respektive 12 °C förkortades jämfört med lagring vid 4 °C. Charkprodukt som förvarades vid 4 °C vid omgång ett hade en lagringstid på över 30 dagar innan den nådde den maximala acceptansnivån på 7 log CFU/g av mjölksyrabakterier. Jämförelse mellan tillväxtkurvorna från omgång ett och två vid 4 °C var inte möjlig då lagringsstudierna avbröts för omgång två innan en hög halt av mjölksyrabakterier hade uppnåtts. Lagringstiden vid 8 °C och 12 °C uppmättes till ungefär 17–20 dagar respektive 10–12 dagar innan de nådde den maximala acceptansnivån.

Resultaten i tabell 5.1 visade att ju lägre initial halt det var av mjölksyrabakterier desto snabbare skedde förskämningen av produkten. Detta var väldigt ologiskt då det borde vara tvärt om, d.v.s. att ju lägre den initiala halten av mjölksyrabakterier var desto långsammare borde förskämningen av produkten ske. Detta kan bero på att det egentligen fanns en lagfas men studierna utfördes under antagandet att det inte fanns någon lagfas för mjölksyrabakterierna. Tillväxthastigheterna i tabell 5.1 var ändå relativt lika för de olika omgångarna/leveranserna vid samma temperatur och därmed kunde resultaten tillämpas för att jämföras med befintliga prognosmodeller. En annan bidragande parameter till att den initiala halten varierade kunde bero på att en viss osäkerhet fås när den initiala halten uppskattas utifrån skärningspunkten som anges vid linjär regression.

Variation i den initiala halten i den rökta skinkan kunde bero på att den mikrobiologiska kvalitén varierade från förpackning till förpackning av produkten. Vid varje provtagning användes tre olika förpackningar, vardera förpackning av skinkan hade en viss initial halt och resultaten från odlingarna som användes för att konstruera tillväxtkurvor baserades på medelvärden av de tre förpackningarna.

Eftersom ingen hänsyn togs till lagfasen för mjölksyrabakterierna fås en ungefärlig initial halt av mjölksyrabakterier. För att ta fram en mer precis initial halt borde provtagningar utföras oftare i början av lagringstiden och dessutom borde det påbörjas från dag noll (den dagen skinkan paketerades) för att kunna konstruera tillväxtkurvor med en tydligare lagfas. Lagfasen gick inte att urskilja från exponentiella fasen i diagram 5.1. Det är dock svårt att studera lagfasen för mikroorganismerna då de oftast finns en låg halt av dem i produkten från början, d.v.s. under detektionsnivå för analysen.

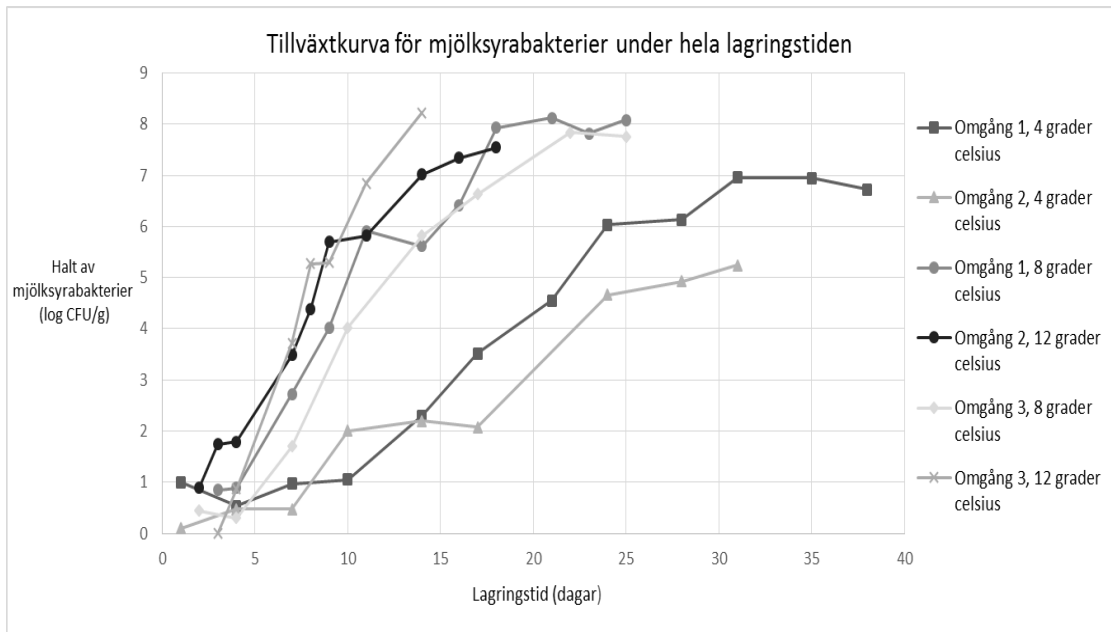


Diagram 5.1: Diagrammet visar tillväxten av halten mjölksyrabakterier (log CFU/g) i form av medelvärden av halten mjölksyrabakterier i tre olika paket under lagringstiden i dagar för var omgång och temperatur.

Tillväxtkurvor konstruerade för den exponentiella fasen för vardera omgången och temperatur (diagram 5.2) klargjorde att tillväxthastigheten ökade vid en högre lagringstemperatur genom att lutningen av kurvorna blev brantare ju högre temperaturen blev (från 4 °C till 12 °C). Kurvans lutning (k) angav den maximala specifika tillväxthastigheten för den förskämmande mikroorganismen för vardera omgången och temperatur. Resultat för linjär regression av tillväxtkurvorna i exponentiella fasen presenteras i tabell 5.1 där ekvationen $y = kx \pm m$ angav både den initiala halten av mjölksyrabakterier (m) och den maximala specifika tillväxthastigheten (k) för vardera omgången och temperatur.

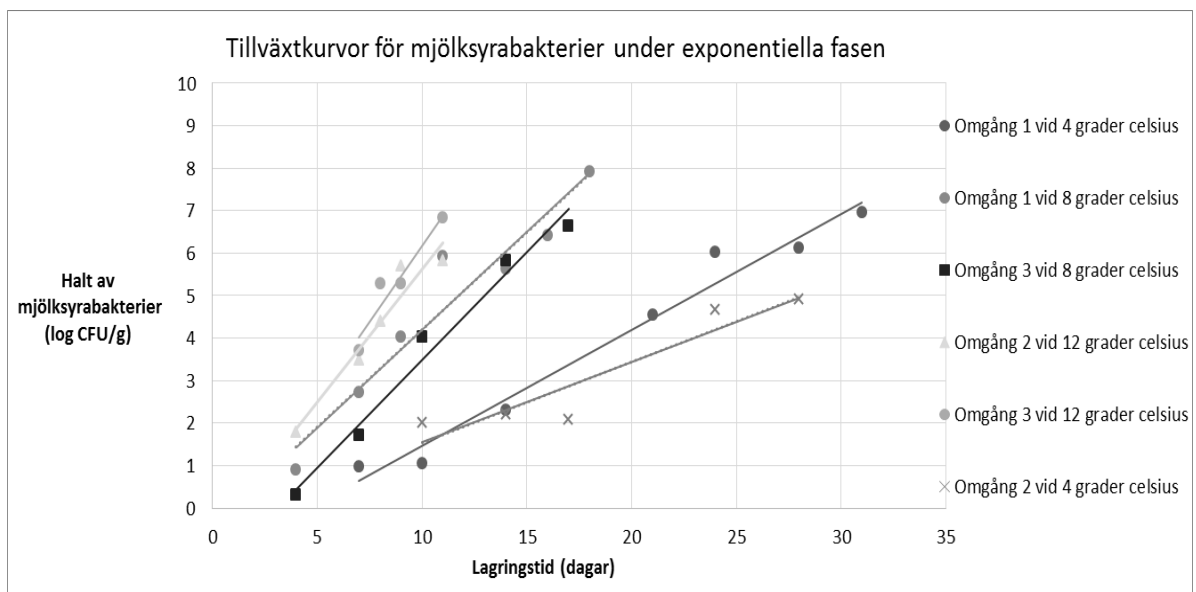


Diagram 5.2: Diagrammet visar tillväxten under exponentiella fasen av halten mjölksyrabakterier (log CFU/g) i form av medelvärden av halten mjölksyrabakterier i tre olika paket under lagringstiden i dagar för var omgång och temperatur.

Tabell 5.1: Tabellen visar en sammanställning av resultat från linjär regression av tillväxtkurvor konstruerade av resultat ifrån lagringsstudier för var omgång och temperatur.

Omgång	T (°C)	Ekvation från linjär regression ($y = kx \pm m$)	R^2	μ_{\max} (d^{-1})	Initial halt av mjölksyrabakterier (log CFU/g)	Initial halt av mjölksyrabakterier (CFU/g)
1	4	$y = 0,2729x - 1,2643$	0,98	0,27	-1,26	0,05
1	8	$y = 0,4602x - 0,4066$	0,93	0,46	-0,41	0,39
2	4	$y = 0,1894x - 0,3487$	0,88	0,19	-0,35	0,45
2	12	$y = 0,6248x - 0,6357$	0,93	0,62	-0,64	0,23
3	8	$y = 0,5073x - 1,5804$	0,98	0,51	-1,58	0,03
3	12	$y = 0,7158x - 0,9842$	0,92	0,72	-0,98	0,10

5.1.2 pH

Uppmätt pH under lagringstiden för skinka som lagrats vid 4, 8 respektive 12 °C visade att pH varierade mellan 5,8 och 6,2 under hela lagringstiden (diagram 5.3). Variationen av pH under lagringstiden berodde på att den mikrobiologiska kvalitén i var förpackning varierade och uppmätt pH i diagrammet baserades på ett medelvärde från prov på tre förpackningar av skinka. Kurvorna i diagrammet som uppgav en möjlig indikation på en pH-sänkning vid en uppnådd halt på 7 log CFU/g var omgång ett vid 4 respektive 8 °C och omgång tre vid 8 respektive 12 °C. Kurvan för omgång två vid 4 °C visade en ökning i pH vid slutet av lagringstiden vilket kunde bero på att lagringsstudierna avslutades efter att en halt på bara 5-6 log CFU/g av mjölksyrabakterier hade uppnåtts. pH vid omgång två vid 12 °C ökade i slutet av lagringstiden vilket är ologiskt då koncentrationen av mjölksyra producerad av mjölksyrabakterierna borde öka när populationen av mikroorganismerna blev större.

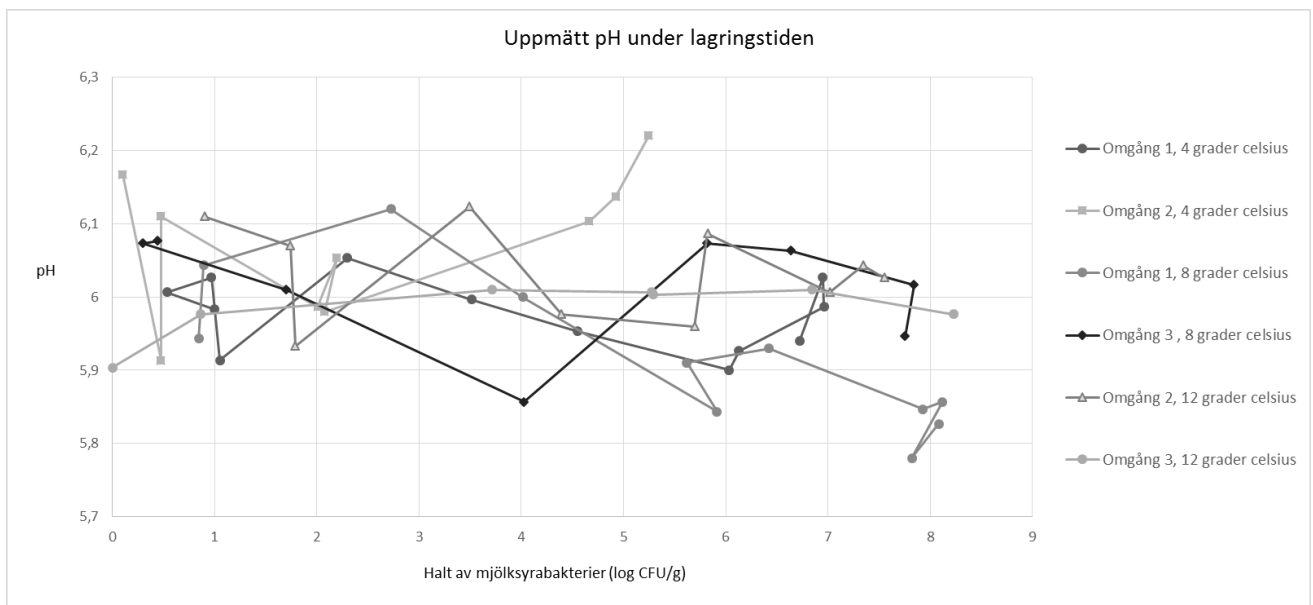


Diagram 5.3 Diagrammet visar uppmätta medelvärden av pH under lagringstiden i samband med tillväxten av medelvärdet av halten mjölksyrabakterier (log CFU/g) för var omgång och temperatur.

5.1.3 Temperatur

Diagram 5.4 visade att inga oväntade händelser i temperatur hade inträffat vid lagringen av skinkan vid 4, 8 respektive 12 °C i kylinkubatorerna, vilket var förväntat då de laborativa experimenten gav relevanta resultat.

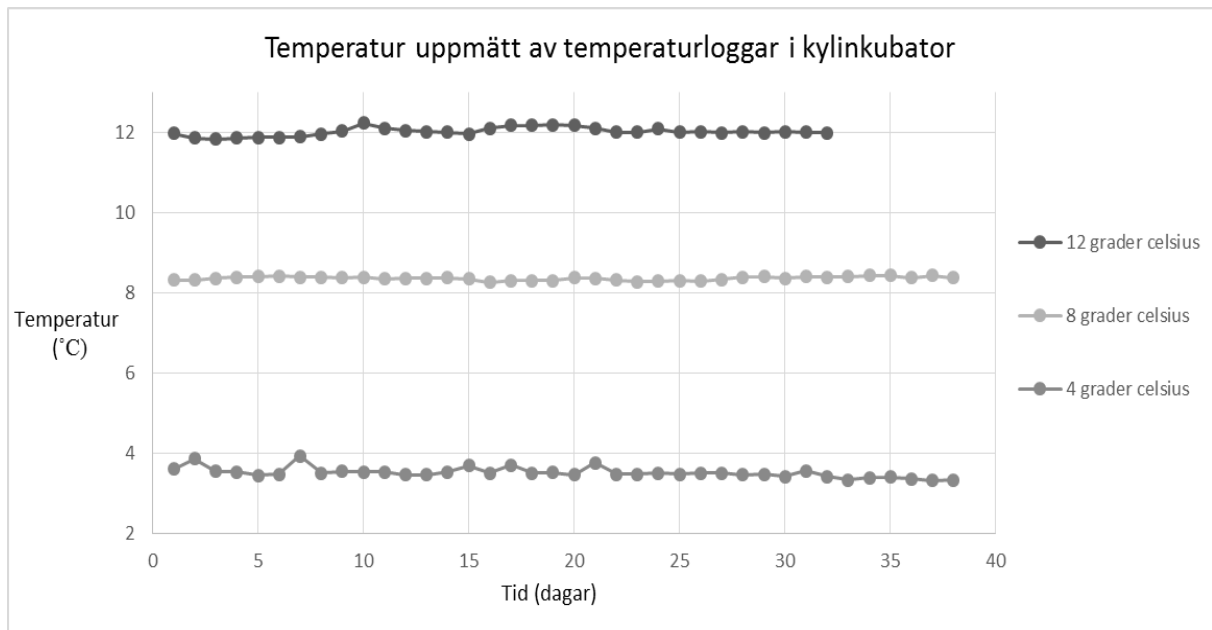


Diagram 5.4 Diagrammet visar medelvärden av temperatur uppmätt av temperaturloggar i kylinkubatorer under lagringstiden vid 4, 8 respektive 12 °C.

5.1.4 Kreyenschmidt et al. (2010)

Med modellen framtagen av Kreyenschmidt et al. (2010) konstruerades tillväxtkurvor vid 4, 8 och 12 °C med linjär regression för halten mjölksyrabakterier (log CFU/g) för jämförelse med tillväxtkurvor framtagna med resultat från lagringsstudier. Diagrammen 5.5–5.7 visade tydligt att tillväxtkurvorna framtagna med modellen av Kreyenschmidt et al. (2010)

underpredikerade tillväxten av mjölksyrabakterierna jämfört med tillväxtkurvorna från lagringsstudierna. Underprediktionen var relativt stor med ca 15 % och kom inte inom ramarna för standardavvikelsen av tillväxtkurvorna från lagringsstudierna. Diagrammen visade även att lutningen för tillväxtkurvorna framtagna med modellen av Kreyenschmidt et al. (2010) för de två olika omgångarna vid samma temperatur var ungefär samma. Detta är för att modellen är uppbyggd på att det är samma tillväxthastighet vid samma temperatur oavsett initial halt. Ekvationerna från den linjära regressionen som angavs i diagrammen 5.5–5.7 visade även detta, då de olika μ_{\max} värdena för samma temperatur var ungefär samma.

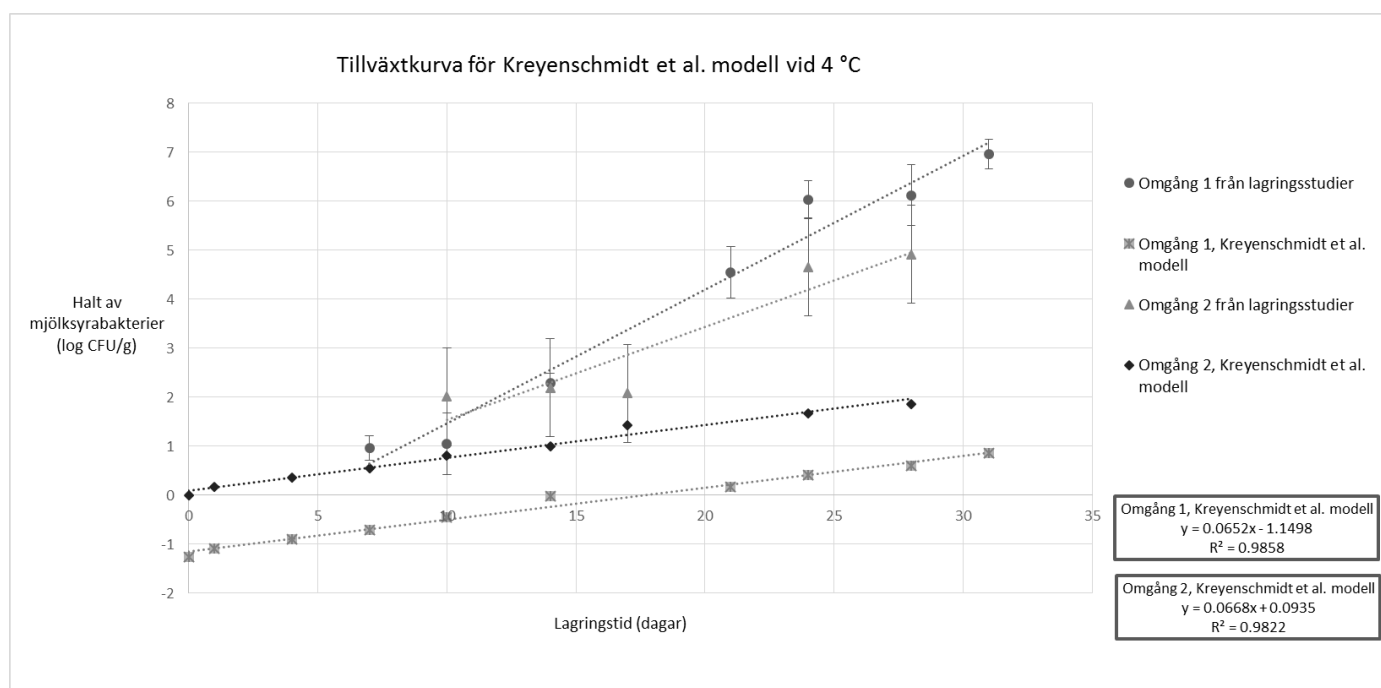


Diagram 5.5 Diagrammet visar medelvärden av analyserad halt mjölksyrabakterier (log CFU/g) under lagring vid 4 °C för omgång 1 respektive 2 med standardavvikelser, samt tillväxten av mjölksyrabakterier (log CFU/g) beräknad med modell framtagen av Kreyenschmidt et al. (2010).

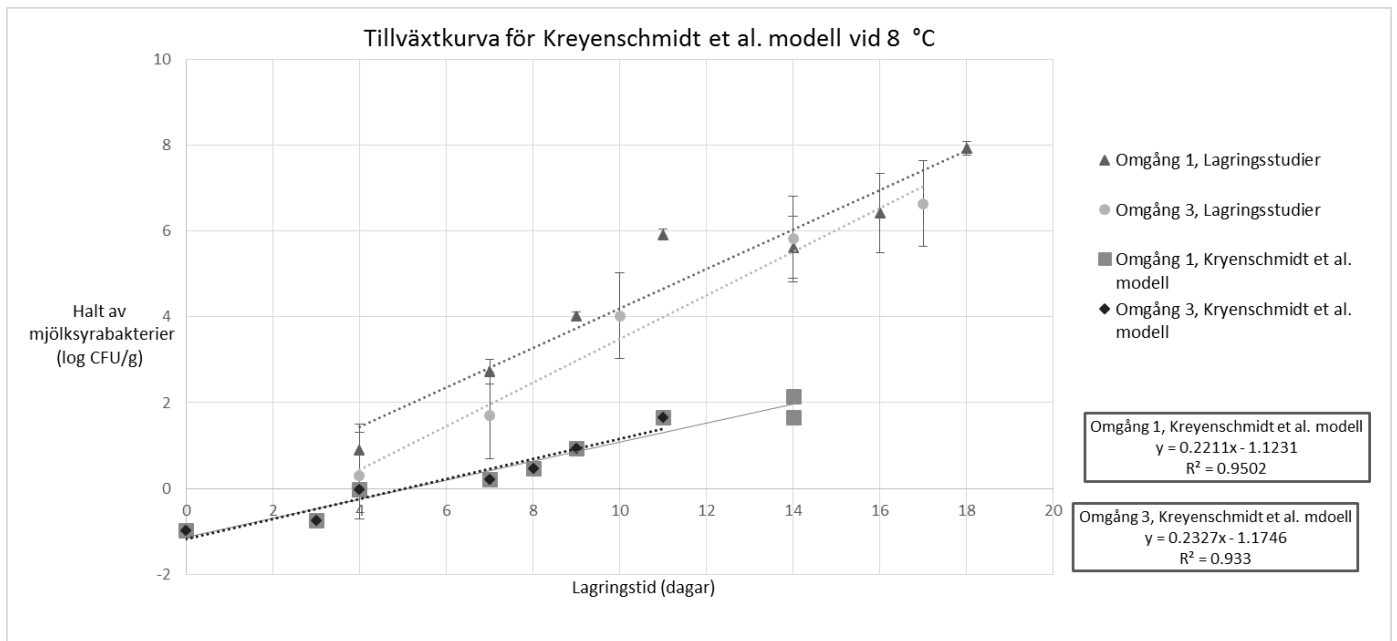


Diagram 5.6 Diagrammet visar medelvärden av analyserad halt mjölksyrabakterier (log CFU/g) under lagring vid 8 °C för omgång 1 respektive 3 med standardavvikelser, samt tillväxten av mjölksyrabakterier (log CFU/g) beräknad med modell framtagen av Kreyenschmidt et al. (2010).

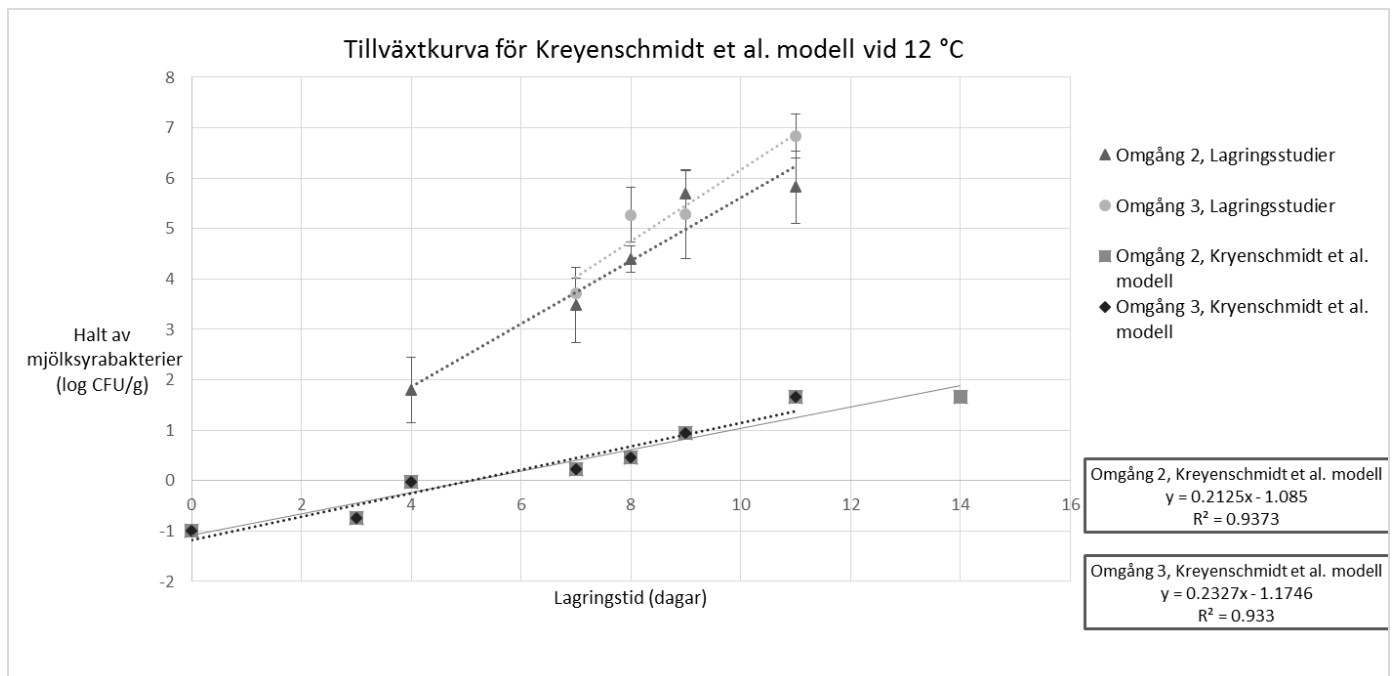


Diagram 5.7 Diagrammet visar medelvärden av analyserad halt mjölksyrabakterier (log CFU/g) under lagring vid 12 °C för omgång 2 respektive 3 med standardavvikelser, samt tillväxten av mjölksyrabakterier (log CFU/g) beräknad med modell framtagen av Kreyenschmidt et al. (2010).

5.1.5 Mataragas et al. (2006)

Med modellen framtagen av Mataragas et al. (2006) konstruerades tillväxtkurvor vid 4, 8 och 12 °C med linjär regression för halten mjölksyrabakterier (log CFU/g) för jämförelse med tillväxtkurvor framtagna med resultat från lagringsstudier. Diagrammen 5.8–5.10 visade att tillväxtkurvorna framtagna med modellen av Mataragas et al. (2006) underpredikterade tillväxten av mjölksyrabakterierna jämfört med tillväxtkurvorna från lagringsstudierna. Underprediktionen var relativt liten med ca 5 %, men kom ändå inte inom ramarna för standardavvikelsen av tillväxtkurvorna från lagringsstudierna. Diagrammen visade även att lutningen för tillväxtkurvorna framtagna med modellen av Mataragas et al. (2006) för de två olika omgångarna vid samma temperatur var samma. Detta är för att modellen är uppbyggd på att det är samma tillväxthastighet vid samma temperatur oavsett initial halt. Ekvationerna från den linjära regressionen som angavs i diagrammen 5.8–5.10 visade även detta, där μ_{\max} för 4, 8 och 12 °C var 0.15, 0.30 respektive 0.58 d⁻¹.

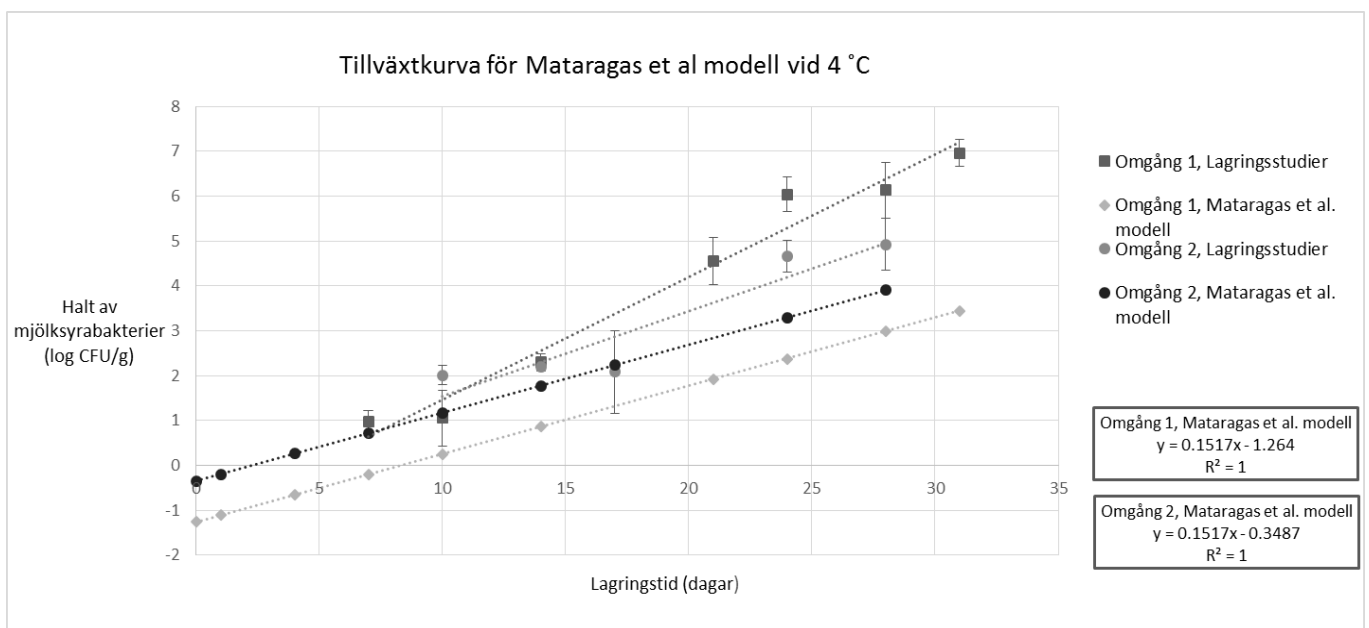


Diagram 5.8 Diagrammet visar medelvärden av analyserad halt mjölksyrabakterier (log CFU/g) under lagring vid 4 °C för omgång 1 respektive 2 med standardavvikelser, samt tillväxten av mjölksyrabakterier (log CFU/g) beräknad med modell framtagen av Mataragas et al. (2006).

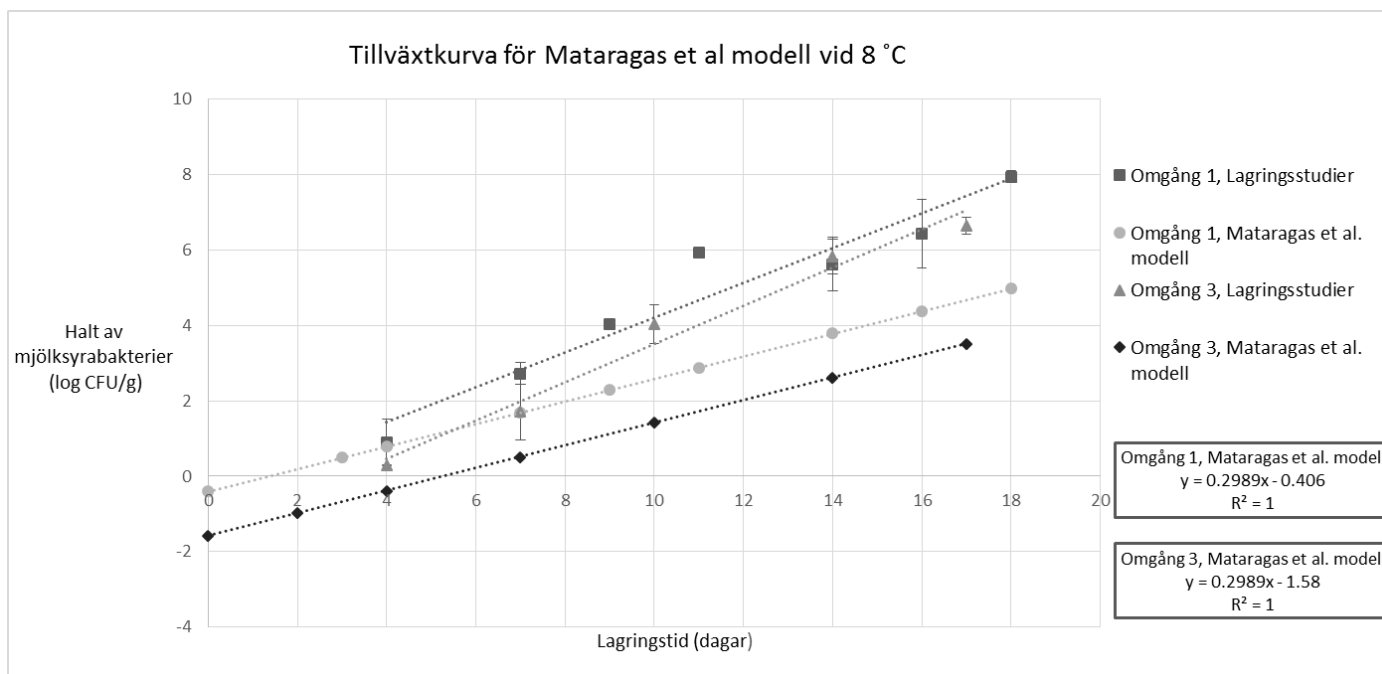


Diagram 5.9 Diagrammet visar medelvärden av analyserad halt mjölksyrabakterier (log CFU/g) under lagring vid 8 °C för omgång 1 respektive 3 med standardavvikelser, samt tillväxten av mjölksyrabakterier (log CFU/g) beräknad med modell framtagen av Mataragas et al. (2006).

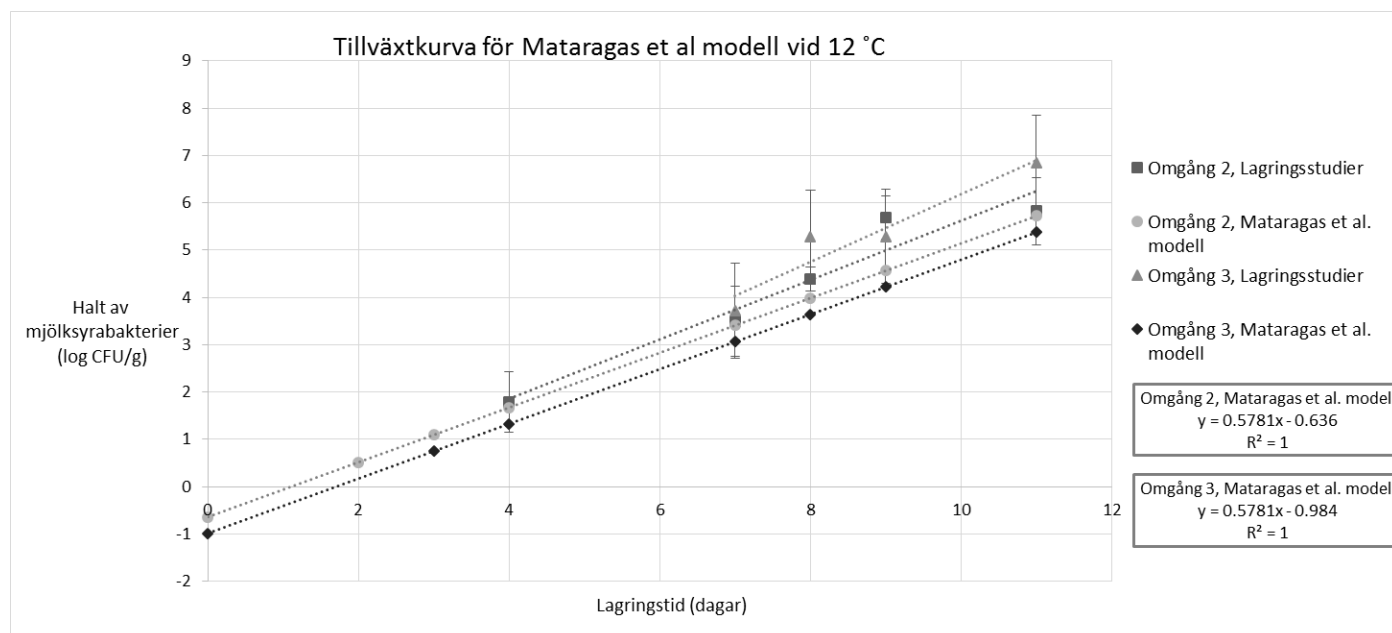


Diagram 5.10 Diagrammet visar medelvärden av analyserad halt mjölksyrabakterier (log CFU/g) under lagring vid 12 °C för omgång 2 respektive 3 med standardavvikelser, samt tillväxten av mjölksyrabakterier (log CFU/g) beräknad med modell framtagen av Mataragas et al. (2006).

5.1.6 Devlieghere et al. (1998, 1999)

Med modellen framtagen av Devlieghere et al. (1998, 1999) konstruerades tillväxtkurvor vid 4, 8 och 12 °C med linjär regression för halten mjölksyrabakterier (log CFU/g) för jämförelse med tillväxtkurvor framtagna med resultat från lagringsstudier. Diagrammen 5.11–5.13 visade att tillväxtkurvorna framtagna med modellen av Devlieghere et al. (1998, 1999) överpredikterade tillväxten av mjölksyrabakterierna jämfört med tillväxtkurvorna från lagringsstudierna. Överprediktionen var relativt liten med ca 6 %, men kom ändå inte inom ramarna för standardavvikelsen av tillväxtkurvorna från lagringsstudierna. Diagrammen visade även att lutningen för tillväxtkurvorna framtagna med modellen av Devlieghere et al. (1998, 1999) för de två olika omgångarna vid samma temperatur var samma. Detta är för att modellen är uppbyggd på att det är samma tillväxthastighet vid samma temperatur oavsett initial halt. Ekvationerna från den linjära regressionen som angavs i diagrammen 5.11–5.13 visade även detta, där μ_{\max} för 4, 8 och 12 °C var 0,38, 0,64 respektive 0,98 d⁻¹.

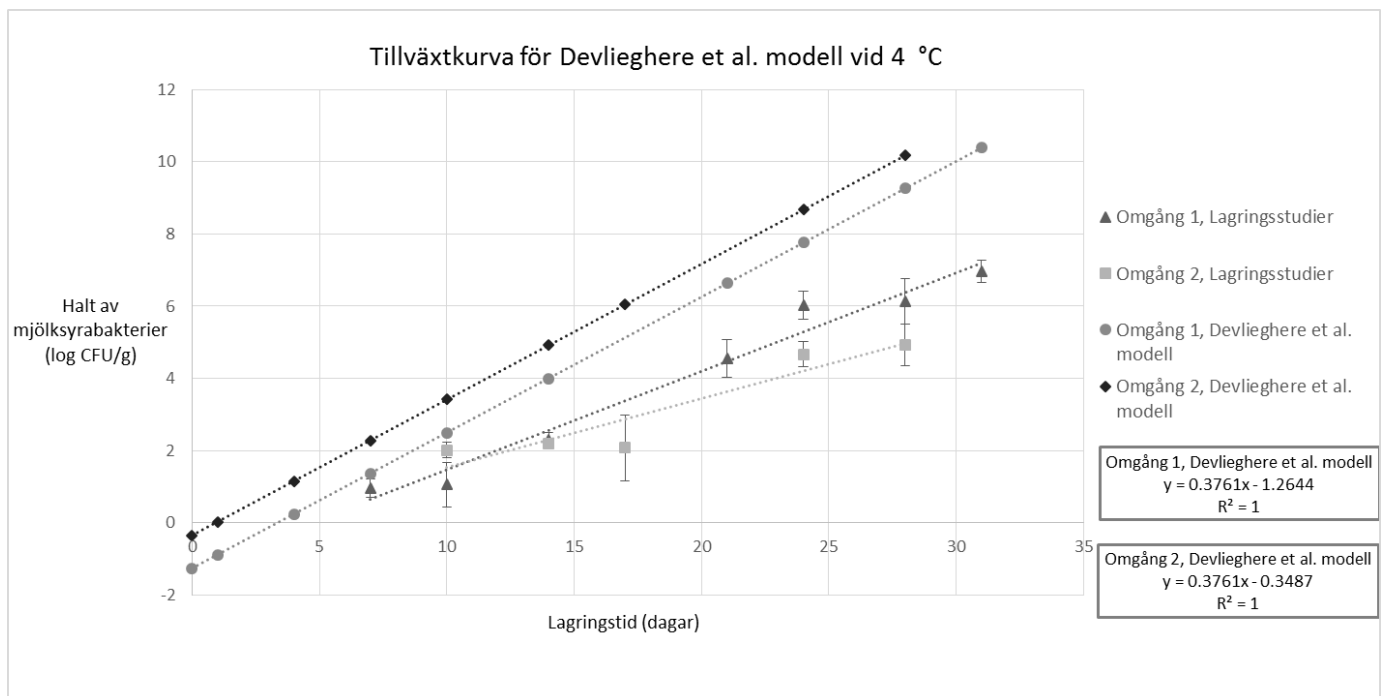


Diagram 5.11 Diagrammet visar medelvärden av analyserad halt mjölksyrabakterier (log CFU/g) under lagring vid 4 °C för omgång 1 respektive 2 med standardavvikelser, samt tillväxten av mjölksyrabakterier (log CFU/g) beräknad med modell framtagen av Devlieghere et al. (1998, 1999).

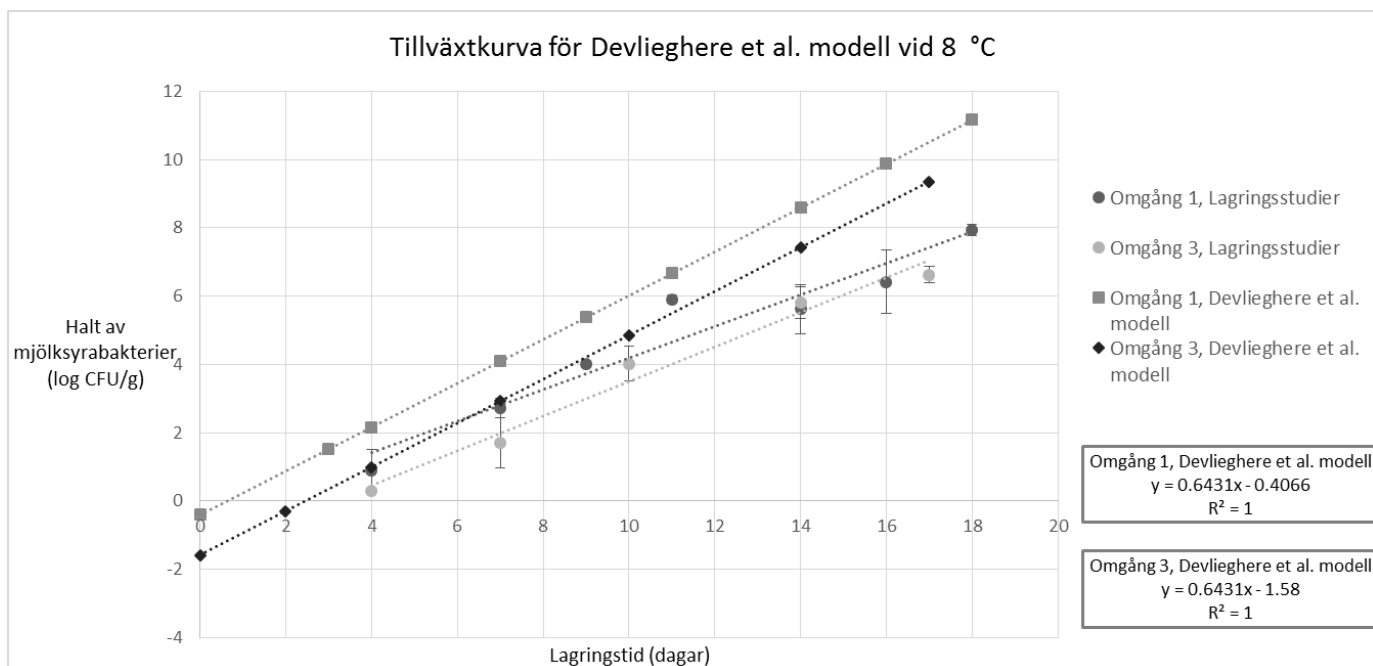


Diagram 5.12 Diagrammet visar medelvärden av analyserad halt mjölksyrabakterier (log CFU/g) under lagring vid 8 °C för omgång 1 respektive 3 med standardavvikelser, samt tillväxten av mjölksyrabakterier (log CFU/g) beräknad med modell framtagen av Devlieghere et al. (1998, 1999).

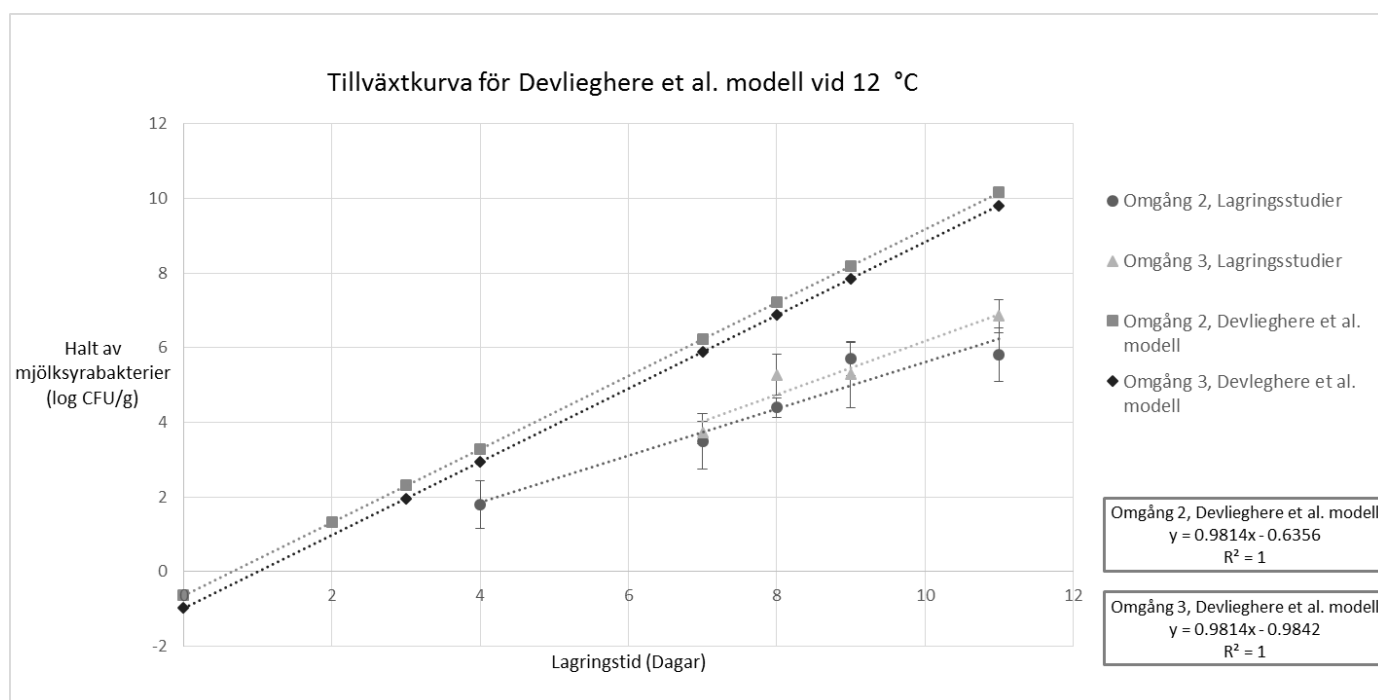


Diagram 5.13 Diagrammet visar medelvärden av analyserad halt mjölksyrabakterier (log CFU/g) under lagring vid 12 °C för omgång 2 respektive 3 med standardavvikelser, samt tillväxten av mjölksyrabakterier (log CFU/g) beräknad med modell framtagen av Devlieghere et al. (1998, 1999).

5.1.7 Bias – och accuracy factor för modeller

Statistiska beräkningar utfördes genom att beräkna bias- och accuracy faktor för att validera prognosmodellerna och för att kunna se hur mycket var modell över- eller underpredikterar. I tabell 5.2 visas olika parametrar som användes vid de statistiska beräkningarna och resultaten av bias- och accuracy faktor samt över- och underprediktion för varje modell.

Tabell 5.2 Tabellen visar en sammanställning av signifikanta parametrar uttagna från modell samt resultat av statistiska beräkningar för de prediktiva modellerna.

Modell	$\sum \mu_{\max, \text{predicted}} (\text{d}^{-1})$	$\sum \mu_{\max, \text{observed}} (\text{d}^{-1})$	n	B_f	A_f	Underprediktion (%)	Överprediktion (%)
Kreyenschmidt et al. (2010)	0,99	2,77	6	0,85	1,19	15,23	
Mataragas et al. (2006)	2,06	2,77	6	0,95	1,05	4,84	
Develieghere et al. (1998, 1999)	0,88	2,77	6	1,06	1,21		5,71

5.1.8 Slutsats och diskussion för jämförelse av tillväxtkurvor med prediktiva modeller

Modellen framtagen av Kreyenschmidt et al. (2010) och Mataragas et al. (2006) underpredikterade tillväxten av mjölksyrabakterier vid 4, 8 och 12 °C. Underprediktionen av tillväxten från modellerna var så stor att den inte kom inom ramarna för standardavvikelseerna för halten mjölksyrabakterier från lagringsstudierna vid någon temperatur eller omgång. Den modell som underpredikterade minst var Mataragas et al modell (4,8 %) och den gav en bra överensstämmelse mellan observerade och predikterade värden ($A_f = 1,05$). Underprediktionen av mjölksyrabakterier var minst vid 12 °C för Mataragas et al. (2006) (diagram 5.10). Anledningen till att modellen fungerade bra kan vara att framtagandet av modellen har utförts på rökt köttprodukter och riktlinjerna för pH, vattenaktivitet, initial halt av mjölksyrabakterier, lagringstemperatur och salthalt är på ett ungefär samma som för MA-packad rökt skinka från Scan. Modellen har dock tagits fram utifrån experiment som utförts på vakuumpackad produkt vilket kan medföra skillnader i den mikrobiella tillväxten.

Att en modell underpredikterar är väldigt farligt då halten av den förskämmande mikroorganismen kan vara högre i produkten än vad som anges i modellen. Kreyenschmidt et al. (2010) underpredikterar den mikrobiella tillväxten med 15,2 % vilket är relativt mycket och även dess accuracy faktor (1,19) visar att de observerade värdena från lagringstudierna skiljer sig från de predikterade värdena från modellen. Detta kan bero på att experimentet utförts på kokt skinka när modellen tagits fram, vilket medför skillnad i vattenaktivitet och ingredienser i produkten som kan påverka den mikrobiella tillväxten. Troligtvis är dessa viktiga parametrar som man borde ta hänsyn till då man utvecklar en prediktiv modell för tillväxt av den förskämmande mikroorganismen.

Vid tillämpningen av modellen framtagen av Devlieghere et al. (1998, 1999) användes parametrar som vattenaktiviteten ($a_w = 0,97$), G/P (2,45) och den initiala halten av koldioxid (30 %), där vattenaktiviteten var ett medelvärde av uppmätta värden från lagringsstudier och G/P hade beräknats på originalförpackningen under de laborativa studierna. Resultaten från modellen framtagen av Devlieghere et al. (1998, 1999) visade att den mikrobiella tillväxten överpredikterades med 5,7 % och den gav en bra prediktion mellan de observerade- och predikterade tillväxthastigheterna ($A_f = 1,21$). Överprediktionen av mjölksyrabakterier var minst vid 8 °C för Devlieghere et al. (1998, 1999) (diagram 5.12). Överprediktion av den mikrobiella tillväxten kan leda till ökat matsvinn, då hållbarheten av produkten förutspås felaktigt och hållbarhetstiden kan ha nått sitt slut innan förskämningen av produkten sker. En stor faktor till att modellen överpredikterar kan bero på att modellen var framtagen av resultat från experiment utförda i buljong. Den mikrobiella tillväxten går snabbare i buljong och parametrar så som koldioxidhalt i gassammansättningen och vattenaktivitet blir annorlunda i buljong på grund av att koldioxiden löser sig lättare i vattenfasen av en produkt.

Enligt Dalgaard.P (2000) är det rimligt att använda sig av en prognosmodell som har en bias faktor mellan 0,75 och 1,25, vilket de tre undersökta prognosmodellerna hade. Dessutom är accuracy faktor för vardera modellen inom rimliga värden, d.v.s. nära ett. Dock är det lämpligast att använda Devlieghere et al. (1998, 1999) för att prediktera den mikrobiella tillväxten, då den överpredikterade den mikrobiella tillväxten vilket är bättre än underprediktion. Dessutom tog den hänsyn till koldioxidhalten och vattenaktiviteten som är två viktiga parametrar som Mataragas et al. (2006) och Kreyenschmidt et al. (2010) inte tog hänsyn till.

5.2 Identifiering av de olika arterna av mjölksyrabakterier i skinkan

Resultat från sekvenseringen (totalt 39 stycken isolat) visade att 54,0 % var *Lactobacillus sakei* (stam: 23K, NBRC 15893, DSM 20017 och CCUG 31331), 41,0 % var *Lactobacillus curvatus* (stam: DSM 20019) och att 5,0 % var *Lactobacillus graminis* (stam: G90) i den rökta MA-packade skinkan från Scan. Förekomsten av *L. curvatus* dominerade i odlingar från skinkan som hade förvarats vid 4 °C och vid 8 respektive 12 °C var det *L. sakei* som dominerade. *L. graminis* förekom vid både 4 °C och 12 °C och eftersom procentsatsen var så liten för *L. graminis* drogs slutsatsen att *L. sakei* och *L. curvatus* var de dominerande arterna av mjölksyrabakterier i skinkan. Enligt tidigare studier, dock på kokt vakuumpackad skinka, visades det att *L. sakei* och *L. curvatus* var de dominanta förskämmande arterna av mjölksyrabakterier.

Från visuell inspektion vid slutet av lagringstiden för skinkan uppmärksammades förändring i färg då produkten fick en ljusare ton av rosa och grått samt slembildning på produkten vid 8 respektive 12 °C. Enligt Borch et al. (1996) orsakas färgförändring och slembildning på köttprodukter av *L. sakei*.

5.3 Tillväxt av *Listeria monocytogenes* i charkprodukten

5.3.1 Tillväxtkurva för mjölksyrabakterier och *L. monocytogenes*

Från resultat av lagringsstudier utförda på skinka ympad med *L. monocytogenes* konstruerades tillväxtkurvor för halten av mjölksyrabakterier samt *L. monocytogenes* för att kunna jämföra tillväxthastigheten av de båda mikroorganismerna och se hur de påverkade varandra. I diagram 5.14 visades det tydligt att tillväxthastigheten av mjölksyrabakterierna var mycket snabbare än tillväxthastigheten för *L. monocytogenes*.

För att vidare kunna jämföra tillväxthastigheten mer noggrant konstruerades nya tillväxtkurvor med linjär regression som visas i diagram 5.15. Ekvationerna från den linjära regressionen visade att tillväxthastigheten av *L. monocytogenes* ($\mu_{\max} = 0,062 \text{ d}^{-1}$) som ympades in i skinkan var långsam och nådde en maximal halt på 3 log CFU/g under 28 dagar. Mjölksyrabakterierna hade en snabbare tillväxthastighet ($\mu_{\max} = 0,661 \text{ d}^{-1}$) och nådde en halt på 8 log CFU/g efter ca 20 dagar (diagram 5.15).

Enligt Develieghere et al. (2001) hämmas tillväxten av *L. monocytogenes* av mjölksyrabakterier på grund av mikrobiell tävling om näring och att en del arter av mjölksyrabakterier som t.ex. vissa stammar av *L. sakei* producerar bakteriociner. Detta är mycket troligt då det har identifierats att den dominanta arten av mjölksyrabakterier i skinkan vid 8 °C var *L. sakei*. Enligt studier utförda av de Souza Barbosa et al. (2014) visades det att stammar av *L. curvatas* också producerade bakteriociner vilket kan hämma tillväxten av *L. monocytogenes*.

Tillväxten av mjölksyrabakterierna i skinkan med *L. monocytogenes* hade en lite snabbare tillväxthastighet än omgång ett och tre vid 8 °C för lagringsstudierna (diagram 5.15 och 5.2). Anledningen till att tillväxthastigheten var snabbare kan bero på att produkten förvarades vid 2 °C i ca tre dagar innan *L. monocytogenes* ympades in i produkten. Även hanteringen av skinkan under ympning, ompackning och förslutning av förpackningarna kan ha bidragit till ökad tillväxthastighet då detta skedde i rumstemperatur. Dock förvarades skinkan och förpackningarna så mycket som möjligt i kylväska för att minimera temperaturpåverkan.

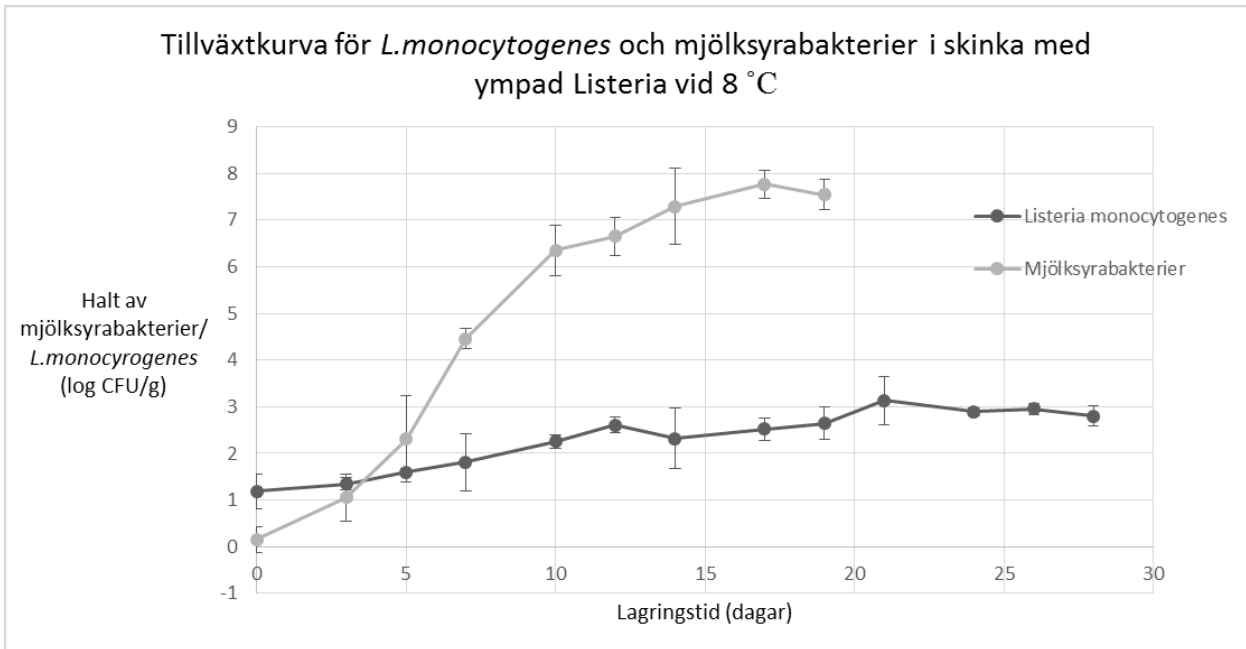


Diagram 5.14 Diagrammet visar tillväxten av halten mjölksyrabakterier samt halten av *L. monocytogenes* (log CFU/g) under lagringstiden i dagar vid 8 °C i form av medelvärden från tre olika paket med skinka ympad med *L. monocytogenes*.

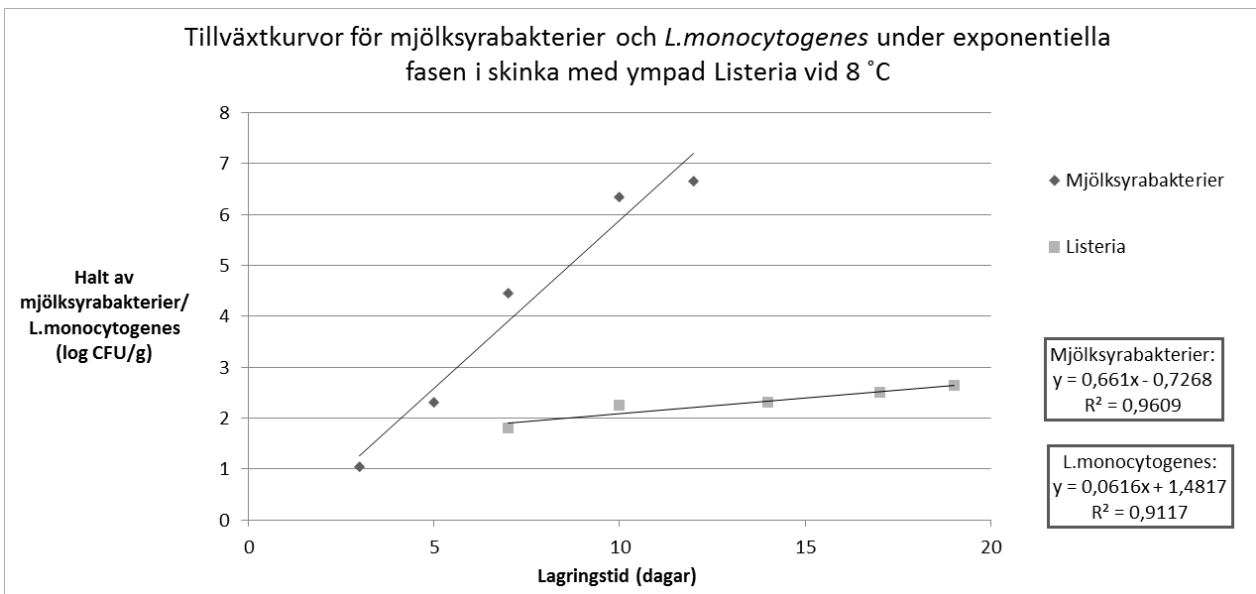


Diagram 5.15: Diagrammet visar tillväxten under exponentiella fasen av halten mjölksyrabakterier samt halten av *L. monocytogenes* (log CFU/g) under lagringstiden i dagar vid 8 °C i form av medelvärden från tre olika paket med skinka ympad med *L. monocytogenes*.

5.3.2 FSSP

Tillväxtkurvor konstruerades för mjölksyrabakterier och *L. monocytogenes* med FSSP-modell för att se mjölksyrabakteriernas inverkan på *L. monocytogenes* tillväxt. Diagram 5.16 visade att tillväxten av mjölksyrabakterier är mycket snabbare än *L. monocytogenes* då den predikterade tillväxten av *L. monocytogenes* och mjölksyrabakterier nådde en maximal halt av 3-4 respektive 8-9 log CFU/g. Den observerade tillväxten av *L. monocytogenes* och mjölksyrabakterier från lagringsstudier av skinka med ympad Listeria gav maximala halter av ca 3 respektive 8 log CFU/g. Förhållandet mellan de uppnådda maximala halterna under lagringstiden för modellen och lagringsstudierna var relativt lika men de predikterade – och observerade värdena för tillväxthastigheten var olika (tabell 5.3). Modellen gav en snabbare tillväxthastighet för både *L. monocytogenes* och mjölksyrabakterier jämfört med resultat från lagringsstudierna.

Vidare konstruerades även en tillväxtkurva för bara *L. monocytogenes* med FSSP-modell för att se tillväxten av den utan inverkan av mjölksyrabakterier. Den predikterade tillväxten av *L. monocytogenes* under 30 dagar nådde en halt på 5-6 log CFU/g, detta var med samma initiala halt av *L. monocytogenes* som i utfört experiment, d.v.s. 100 CFU/g. Vid framtagandet av tillväxtkurvorna med FSSP modellen angavs en halt av rökkomponenter i modellen till 0 ppm på grund av avsaknad av denna information. Detta kan också vara en orsak till att modellen överpredikterade tillväxten av både mjölksyrabakterier och *L. monocytogenes*. Med modellens prediktioner jämfört med resultat från lagringsstudier samt resultat från sekvenseringen kunde man dra slutsatsen att *L. monocytogenes* hämmades av att mjölksyrabakterierna producerade bakteriociner eller konkurrens om näring.

Tillväxtkurva för mjölksyrabakterier och *L. monocytogenes* vid 8°C

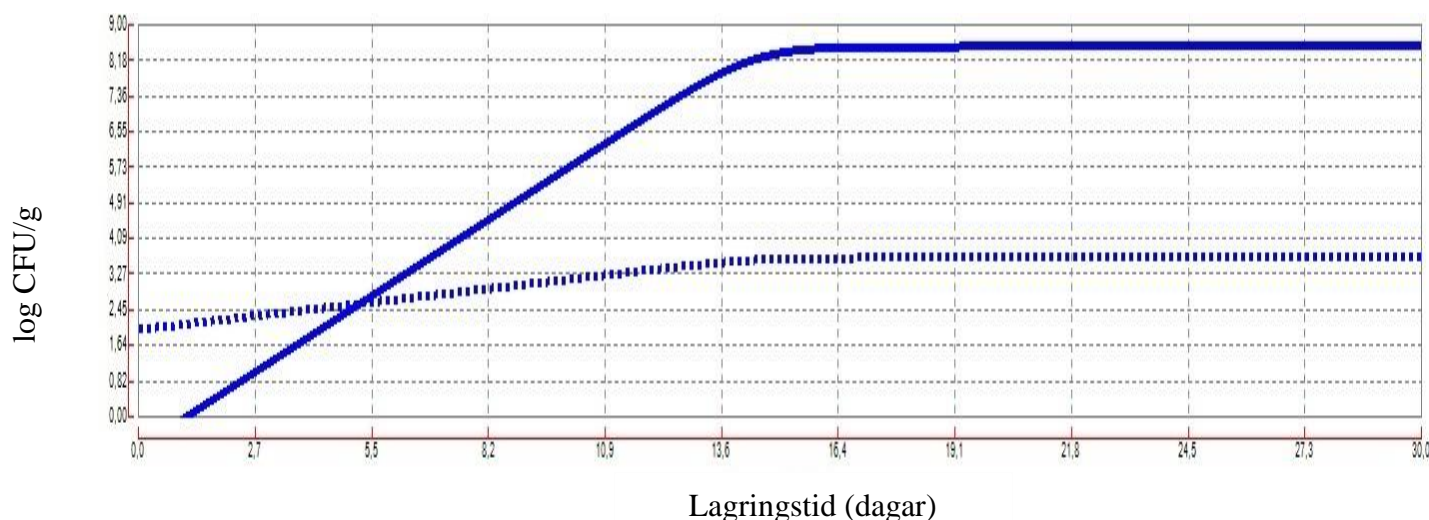


Diagram 5.16 Diagrammet visar halten av *L. monocytogenes* (streckad linje) och mjölksyrabakterier (heldragen linje) log CFU/g under lagring vid 8 °C framtagen med FSSP-modell.

Tillväxtkurva för *L. monocytogenes* vid 8°C

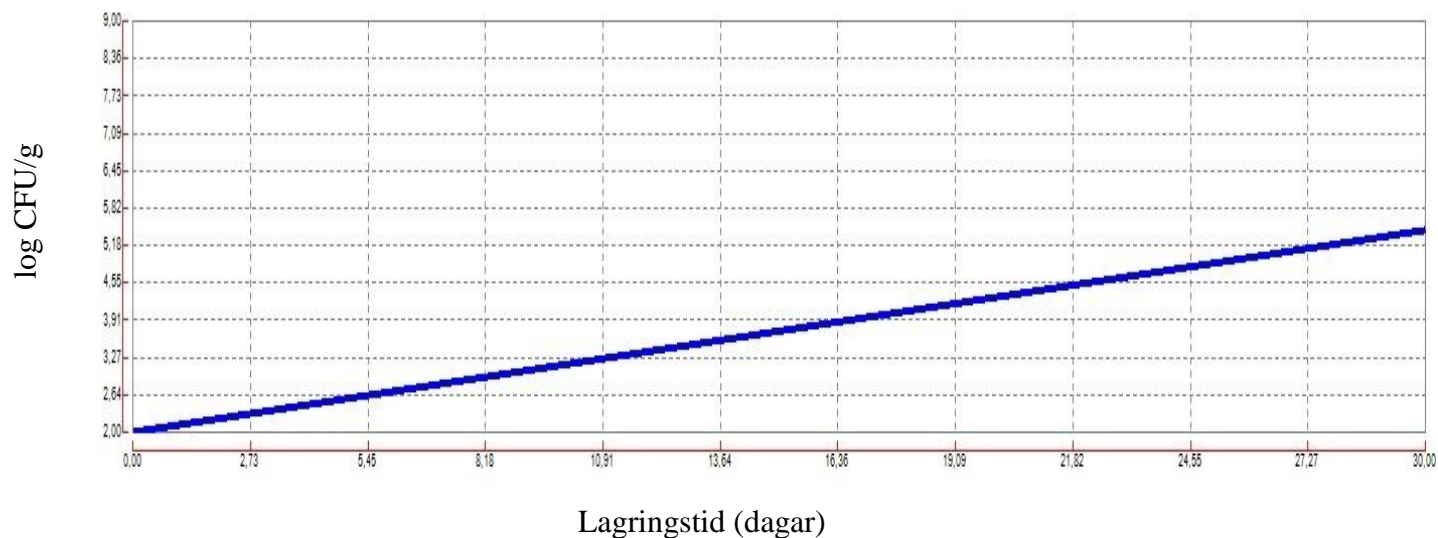


Diagram 5.17 Diagrammet visar halten av *L. monocytogenes* (log CFU/g) under lagring vid 8 °C framtagen med FSSP-modell.

Tabell 5.3 Sammanställning av tillväxthastigheter för *L. monocytogenes* och mjölksyrabakterier framtagna från lagringsstudier och FSSP-modell.

Mikroorganism	μ_{\max} FSSP-modell (d ⁻¹)	μ_{\max} lagringsstudier (d ⁻¹)
<i>L. monocytogenes</i>	0,26	0,06
Mjölksyrabakterier	1,48	0,66

6. Slutsats

Lagringsstudier visade att förvaringstemperaturen påverkade tillväxten av mjölksyrabakterier och en kortare hållbarhet gavs av den rökta skinkan vid förvaring vid en högre lagringstemperatur än 4 °C. Resultat från sekvensering visade att de dominanta arterna av mjölksyrabakterier vid lagringsstudierna av den rökta skinkan var *Lactobacillus curvatus* vid 4 °C och *Lactobacillus sakei* vid 8 respektive 12 °C.

Bestämningen av den initiala halten utifrån lagringsstudierna varierade mellan 0,05 och 0,45 CFU/g och detta berodde troligtvis på att ingen hänsyn togs till att det kanske fanns en lagfas för mjölksyrabakterierna. Dessutom fanns det en viss osäkerhet när den initiala halten bestämts utifrån skärningsspunkten och att den initiala halten hade en naturlig variation av mikrobiologisk kvalitet från förpackning till förpackning.

Statistisk analys av de tre befintliga prognosmodellerna visade att modellerna var tillämpbara för att prediktera tillväxten av mjölksyrabakterier på grund av att deras bias faktor låg inom lämpliga ramar (0,75–1,25). Dock ska det vid tillämpning av prognosmodellerna ha i åtanke att Kreyenschmidt et al. (2010) och Mataragas et al. (2006) underpredikterade den mikrobiella tillväxten vilket är farligt då förskämningen sker snabbare än vad modellen predikterar. Modellen framtagen av Devlieghere et al. (1998, 1999) var därför bättre att använda då den överpredikterade med en liten procentsats och att den tar hänsyn till parametrar som kan vara viktiga då tillväxten av mjölksyrabakterier predikteras.

Resultat från lagringsstudierna av skinka med ympad *Listeria monocytogenes* vid 8 °C visade att tillväxten av *L. monocytogenes* var långsam i skinkan vilket troligtvis berodde på tillväxt av mjölksyrabakterier som antingen bildade bakteriociner eller att de två mikroorganismerna konkurrerade om näringen i skinkan. Genom kontroll med FSSP modellen bekräftades detta och att tillväxten av *L. monocytogenes* gick fortare utan inverkan av mjölksyrabakterier i en köttprodukt.

Referenser

- AQUA LAB. 2015. *Microbial Growth* [Online]. Available: <http://www.aqualab.com/applications/microbial-growth/> [Accessed 2015-01-02].
- BORCH, E., KANT-MUERMANS, M.-L. & BLIXT, Y. 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 103-120.
- DALGAARD, P. 2000. Fresh and lightly preserved seafood. *Shelf Life Evaluation of Foods*. United States Of America: Springer Science & Business Media.
- DE SOUZA BARBOSA, M., TODOROV, S. D., IVANOVA, I., CHOBERT, J.-M., HAERTLÉ, T. & DE MELO FRANCO, B. D. G. 2015. Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. *Food Microbiology*, 46, 254-262.
- DEVLIEGHERE, F., DEBEVERE, J. & VAN IMPE, J. 1998. Concentration of carbon dioxide in the water-phase as a parameter to model the effect of a modified atmosphere on microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 105-113.
- DEVLIEGHERE, F., GEERAERD, A. H., VERSYCK, K. J., VANDEWAETERE, B., VAN IMPE, J. & DEBEVERE, J. 2001. Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *Food Microbiology*, 18, 53-66.
- DEVLIEGHERE, F., VAN BELLE, B. & DEBEVERE, J. 1999. Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *International Journal of Food Microbiology*, 46, 57-70.
- DTU, N. F. I.-. 2014a. *Listeria monocytogenes and lactic acid bacteria (LAB) in lightly preserved seafood including ready-to-eat products* [Online]. Available: <http://fssp.food.dtu.dk/Help/Listeria/Lm-LAB/lm-lab.htm> [Accessed 2015-01-02].
- DTU, N. F. I.-. 2014b. *Listeria monocytogenes growth and growth boundary models* [Online]. Available: <http://fssp.food.dtu.dk/Help/Listeria/Lm/lm.htm> [Accessed 2015-01-02].
- DYNAHMAT. 2013. *Chip i maten kan komma att ersätta datummärkning* [Online]. Available: <http://dynahmat.com/artikel-i-metro/> [Accessed 2014-12-03].
- DYNAHMAT. 2014. Available: <http://dynahmat.com/> [Accessed 2014-11-24].
- EGAN, A. 1983. Lactic acid bacteria of meat and meat products. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 327-336.
- EXTENSION, T. A. M. A. u.å. *Food Technology and Processing* [Online]. Available: <http://aggie-horticulture.tamu.edu/food-technology/food-processing-entrepreneurs/microbiology-of-food/> [Accessed 2014-12-15].
- FAO. 2013. Effect of bacterial growth on the shelf-life of meat and meat products [Online]. Available: <http://www.fao.org/docrep/004/T0279E/T0279E03.htm> [Accessed 2015-01-02].
- HU, P., ZHOU, G., XU, X., LI, C. & HAN, Y. 2009. Characterization of the predominant spoilage bacteria in sliced vacuum-packed cooked ham based on 16S rDNA-DGGE. *Food Control*, 20, 99-104.
- KRAFT, A. A. 1992. *Psychrotrophic Bacteria in Foods- Disease and Spoilage*, United States Of America, CRC Press, Inc.
- KREYENSCHMIDT, J., HÜBNER, A., BEIERLE, E., CHONSCH, L., SCHERER, A. & PETERSEN, B. 2010. Determination of the shelf life of sliced cooked ham based on the growth of lactic acid bacteria in different steps of the chain. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 510-520.

- LIVSMEDELSVERKET. 2013. *Uppdrag för minskat matsvinn* [Online]. Available: <http://www.slv.se/sv/grupp1/Mat-och-miljo/Ta-hand-om-maten--minskat-svinnet/Uppdrag-for-minskat-matsvinn/> [Accessed 2014-11-12].
- LIVSMEDELSVERKET. 2014a. *Listeria monocytogenes - fördjupning* [Online]. Available: <http://www.slv.se/sv/grupp1/Risker-med-mat/Bakterier-virus-och-parasiter/Listeria-monocytogenes/> [Accessed 2014-11-26].
- LIVSMEDELSVERKET. 2014b. *Vad är det som slängs vid utgången hållbarhetsdatum?* [Online]. Available: www.slv.se/sv/Settings/Sok/?quicksearchquery=f%C3%B6rsk%C3%A4mning [Accessed 2014-11-26].
- MATARAGAS, M., DROSINOS, E. H., VAIDANIS, A. & METAXOPOULOS, I. 2006. Development of a Predictive Model for Spoilage of Cooked Cured Meat Products and Its Validation Under Constant and Dynamic Temperature Storage Conditions. *Journal of Food Science*, 71, M157-M167.
- MELLEFONT, L. A., MCMEEKIN, T. A. & ROSS, T. 2008. Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 157-168.
- NATURVÅRDSVERKET. 2014. *Matsvinn* [Online]. Available: <http://www.naturvardsverket.se/Miljoarbete-i-samhallet/Miljoarbete-i-Sverige/Uppdelat-efter-omrade/Avfall/Avfallsforebyggande-program/Matsvinn/> [Accessed 2014-11-24].
- PÄRSSONS. u.å. *Tunna skivor / Rökt Gourmetskinka* [Online]. Available: <http://www.parsons.se/produkter/rokt-gourmetskinka-0> [Accessed 2014-12-13].
- ROSS, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *The Journal of applied bacteriology*, 81, 501-508.
- SAMELIS, J., KAKOURI, A. & REMENTZIS, J. 2000. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *Food Microbiology*, 17, 329-340.
- UNIPROT. 2014. *Lactobacillus sakei subsp. sakei (strain 23K)* [Online]. Available: <http://www.uniprot.org/proteomes/UP000002707> [Accessed 2014-12-17].
- VAIKOUSI, H., BILIADERIS, C. G. & KOUTSOUMANIS, K. P. 2008. Development of a Microbial Time/Temperature Indicator Prototype for Monitoring the Microbiological Quality of Chilled Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 3242-3250.
- VALERO, A. & PÉREZ-RODRÍGUEZ, F. 2013. *Predictive Microbiology in Foods*, Springer New York.

Bilaga 1: FSSP – parametrar för mjölksyrabakterier och *L. monocytogenes*

I följande bilaga visas de parametrar som ställdes in för prediktion av tillväxten för mjölksyrabakterier och *L. monocytogenes* med FSSP modellen.

- Där den initiala halten av *L. monocytogenes* var densamma som halten som ympades in i produkten vid belastningsstudierna.
- Inhibiting effect kan vara mellan noll och två och den ställdes in på ett då information saknades för denna parameter.
- Den initiala koncentration (CFU/g) av mjölksyrabakterier togs ut ifrån skärningspunkten som angavs vid linjär regression för mjölksyrabakterier i diagram 5.15.
- Temperaturen sattes till 8 °C då det var samma temperatur som användes under belastningsstudierna för lagring av produkten.
- Salthalten i vattenfasen har beräknades utifrån salthalten i Pärsson rökta skinka från Scan där produktens salthalt dividerade med dess vattenhalt.
- Ett pH värde valdes till 6,0 då det var ett medelvärde av uppmätta pH från lagringsstudier.
- Information om rökkomponenter i skinkan var inte känt så den sattes till noll.
- Koldioxidhalten vid jämvikt i produktförpackningen var 20 % då reseterande har löst sig i produktens vattenfas.
- Nitrithalten för den rökta skinkan angavs av Scan och den var 150 ppm.
- En lagringstid valdes till 30 dagar då belastningsstudierna pågick ungefär så länge.

Product characteristics	Product 1	Product 2
L. m. initial cell level (cfu/g)	100	
Include lag time for L. monocytogenes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Inhibiting effect factor of LAB on L.m.	1.0	0.0
LAB initial conc. (cfu/g)	0.1876	100
Temperature (°C)	8.0	5.0
NaCl in water phase %	4.0	4.0
pH	6.0	6.2
Smoke components - phenol (ppm)	0	10
% CO2 in headspace gas at equilibrium	20	0
Nitrite	150	

Organic acids in water phase of product	Product 1	Product 2
Acetic acid (ppm)	0	0
Benzoic acid (ppm)	0	0
Citric acid (ppm)	0	0
Diacetate (ppm)	0	0
Lactic acid (ppm)	0	0
Sorbic acid (ppm)	0	0

Bilaga 2: FSSP – parametrar för *L. monocytogenes*

I följande bilaga visas de parametrar som ställdes in för prediktion av tillväxten för *L. monocytogenes* utan inverkan av mjölksyrabakterier med FSSP modellen.

- Där den initiala halten av *L. monocytogenes* var densamma som halten som ympades in i produkten vid belastningsstudierna.
- Temperaturen sattes till 8 °C då det var samma temperatur som användes under belastningsstudierna för lagring av produkten.
- Salthalten i vattenfasen har beräknades utifrån salthalten i Pärsson rökta skinka från Scan där produktens salthalt dividerade med dess vattenhalt.
- Ett pH värde valdes till 6,0 då det var ett medelvärde av uppmätta pH från lagringsstudier.
- Information om rökkomponenter i skinkan var inte känt så den sattes till noll.
- Koldioxidhalten vid jämvikt i produktförpackningen var 20 % då reseterande har löst sig i produktens vattenfas.
- Nitrithalten för den rökta skinkan angavs av Scan och den var 150 ppm.
- En lagringstid valdes till 30 dagar då belastningsstudierna pågick ungefär så länge.

Product characteristics	Product 1	Product 2
L. monocytogenes initial cell level (cfu/g)	100	10
Temperature (°C)	8.0	8.0
NaCl in water phase %	4.0	4.0
pH	6.0	6.0
Smoke components - phenol(ppm)	0	0
% CO2 in headspace gas at equilibrium	20	20
Nitrite, mg/kg	150	150
Storage period (d)	30	30
Include lag time for L. monocytogenes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Organic acids in water phase of product	Product 1	Product 2
Acetic acid (ppm)	0	0
Benzoic acid (ppm)	0	0
Citric acid (ppm)	0	0
Diacetate (ppm)	0	0
Lactic acid (ppm)	0	0
Sorbic acid (ppm)	0	0