



Rapport

Nye proteinkombinationer

Vurdering af mikrobielle risici ved brug af vegetabiliske proteiner i kødprodukter

Anette Granly Koch

16. september 2020

Proj.nr. 2007970

Version 2

Init. AGLK/BGS/MT/LHHR

Sammendrag

Formål

I projektet produceres en række nye produkter med en kombination af kød- og planteproteiner. Der ønskes en vurdering af, om det påvirker fødevarer sikkerhed og holdbarhed af de produkter, der produceres. Spørgsmålet vedr. mikrobiologi er:

- kan tilsætning af planteprotein introducere nye sporedannende bakterier, som kan påvirke holdbarhed og fødevarer sikkerhed?

Konklusion

Tilsætning af 10-15% planteprotein **kan øge kimtallet (vegetative celler og sporer)** i recepten. Produktet skal derfor varmebehandles og konserveres. Holdbarheden skal afpasses efter dette let øgede tryk fra sporer og vegetative bakterier. Der skal stilles krav til leverandører med fokus på lav forekomst af sporer og skimmel samt fravær af virus, parasitter og skimmeltoksiner i planteproteinprodukterne, fx gennem leverandøraudit.

Kimtallet kan forventes at være højere end det, der findes i frisk kød. I grøntsager kan der ofte findes 10^4 - 10^6 CFU/g. Reduktion af kimtallet kræver, at grøntsagsingredienserne varmebehandles, og at produktionshygiejnen er høj under tørring, så vækst og kontaminering undgås.

Tilsætning af 10-15% planteprotein kan tilføre **lidt flere sporer**, end der fås ved tilsætning af 1% krydderier. Og de tørrede planteproteiner vil bidrage med et større sporetal, end der er i det kød, de erstatter. Derfor skal varmebehandlingen, konserveringen og holdbarheden afpasses efter dette let øgede tryk med sporer og vegetative bakterier.

God hygiejne under dyrkning af grøntsager samt produktion hindrer, at produkterne kontamineres med **parasitter og virus**. Der skal anvendes rent vand, og syge personer må ikke være involveret i produktionen af planteprotein eller kødprodukter.

Der skal stilles krav til leverandørerne om fravær/maksimalt indhold af bestemte **skimmeltoksiner**. Grænseværdier er reguleret af EU, og de fremgår af Commission Regulation (EC) No. 1881/2006²⁰.

I de følgende to tabeller er der givet et overblik over, hvad øget tilsætning af planteprotein betyder for:

- Fødevarer sikkerhed, **tabel 1**
- Mikrobiologisk holdbarhed, **tabel 2**

Tabel 1. Mikrobiologisk Fødevarerikkerhed – oversigt

Mikrobiologiske agens	Færdigvare (kød med 10-15% planteprotein)		
	Pasteuriseret (72°C/2 minutter) i detailemballage	Pasteuriseret (72°C/2 minutter) slicet og pakket	Autoklaveret (121°C/3 minutter)
Vegetative bakterieceller fx listeria, salmonella, Yersinia, E. coli m.fl.	Inaktiveres ved varmebehandlingen Ingen rekontaminering, når produktet ikke ompakkes	Inaktiveres ved varmebehandlingen Rekontaminering ved slicening og pakning, hvilket har stor betydning for fødevarerikkerhed fx listeria	Inaktiveres ved varmebehandlingen Ingen rekontaminering, når produktet ikke ompakkes
Konklusion: Planteproteiner kan tilføre flere vegetative bakterier og andre arter af bakterier end kødråvarer. Varmebehandlingen inaktiverer disse.			
Sporedannere med middel varmeresistens fx <i>Bacillus cereus</i> , <i>Clostridium botulinum</i> og <i>Clostridium perfringens</i>	Inaktiveres ikke ved varmebehandlingen Konservering (salt, nitrit, organiske syrer, pH) samt lagringstemperatur skal vælges, så vækst ikke er mulig	Inaktiveres ikke ved varmebehandlingen Konservering (salt, nitrit, organiske syrer, pH) samt lagringstemperatur skal vælges, så vækst ikke er mulig	Inaktiveres ved varmebehandlingen Ingen rekontaminering, når produktet ikke ompakkes
Konklusion: Planteproteiner kan tilføre flere sporedannende bakterier og andre arter af sporedannende bakterier end kødråvarer. Varmebehandling til 72°C inaktiverer IKKE disse. Autoklavering (konserveres) sikrer inaktivering af de tre sporedannende fødevarerborne patogener, der er fokus på. Dog kan de mest varmeresistente <i>C. perfringens</i> overleve 121°C/3 minutter. Konservering med salt og nitrit skal hindre vækst.			
Sporedannere med høj varmeresistens fx de mest varmeresistente <i>Clostridium perfringens</i>	Inaktiveres ikke ved varmebehandlingen Konservering (salt, nitrit, organiske syrer, pH) samt lagringstemperatur skal vælges, så vækst ikke er mulig. <i>C. perfringens</i> vokser ikke ved køleopbevaring, men vigtigt med hurtig nedkøling	Inaktiveres ikke ved varmebehandlingen Konservering (salt, nitrit, organiske syrer, pH) samt lagringstemperatur skal vælges så vækst ikke er mulig. <i>C. perfringens</i> vokser ikke ved køleopbevaring, men vigtigt med hurtig nedkøling.	Inaktiveres ikke ved varmebehandlingen Konservering (salt, nitrit, organiske syrer, pH) samt lagringstemperatur skal vælges, så vækst ikke er mulig Især ved salg i tropiske egne (>40°C) kan der være risiko for vækst. Kræver konservering eller kraftigere varmebehandling
Konklusion: Planteproteiner kan tilføre flere sporedannende bakterier og andre arter af sporedannende bakterier end kødråvarer. Varmebehandling til 72°C inaktiverer IKKE disse. Autoklavering (konserveres) til 121°C/3 minutter inaktiverer IKKE alle disse. Konservering med fx salt, organiske syrer og nitrit skal hindre vækst.			
Skimmeltoksiner	Inaktiveres ikke . Dannes under vækst af skimmel på råvarerne. Risiko øget i forhold til kødråvarer. Leverandørgaranti og audit skal sikre fravær.		
Virus	Nogle kan overleve	Nogle kan overleve	Inaktiveres
	Konklusion: risiko øget i forhold til kødråvarer. Produktionshygiejnen skal være høj fra råvare til færdigvare.		
Parasitter	Inaktiveres	Inaktiveres	Inaktiveres
	Konklusion: risiko øget i forhold til kødråvarer. Produktionshygiejnen skal være høj fra råvare til færdigvare.		

Tabel 2. Mikrobiologisk holdbarhed (fordærv) – oversigt

	Færdigvare (kød med 10-15% planteprotein)		
Mikrobiologisk agens	Pasteuriseret (72°C/2 minutter) i de-tailemballage	Pasteuriseret (72°C/2 minutter) slicet og pakket	Autoklaveret (121°C/3 minutter)
Vegetative bakterie-celler fx mælkesyre-bakterier, Brochotrix, Pseudomonas, Entero-bacteriaceae. Photo-bacterium m.fl.	Inaktiveres ved varme-behandlingen Ingen rekontaminering, når produktet ikke ompakkes	Inaktiveres ved varme-behandlingen Rekontaminering ved slicening og pakning Rekontaminering har stor betydning for holdbarhed	Inaktiveres ved varmebe-handlingen Ingen rekontaminering, når produktet ikke ompakkes
Konklusion: Plante proteiner kan tilføje flere vegetative bakterier og andre arter af bakterier end kødråvarer. Varmebehandlingen inaktiverer disse.			
Sporedannere med middel varmeresistens	Inaktiveres ikke ved varmebehandlingen Konservering (salt, nitrit, organiske syrer, pH) samt lagringstemperatur skal vælges, så vækst ikke er mulig	Inaktiveres ikke ved varmebehandlingen Konservering (salt, nitrit, organiske syrer, pH) samt lagringstemperatur skal vælges, så vækst ikke er mulig	Inaktiveres ved varmebe-handlingen Ingen rekontaminering, når produktet ikke ompakkes
Konklusion: Plante proteiner kan tilføje flere sporedannende bakterier og andre arter af sporedannende bakterier end kødråvarer. Varmebehandling til 72°C inaktiverer IKKE disse. Autoklaving (konserves) sikrer inaktivering			
Sporedannere med høj varmeresistens	Inaktiveres ikke ved varmebehandlingen Konservering (salt, nitrit, organiske syrer, pH) samt lagringstemperatur skal vælges, så vækst ikke er mulig	Inaktiveres ikke ved varmebehandlingen Konservering (salt, nitrit, organiske syrer, pH) samt lagringstemperatur skal vælges, så vækst ikke er mulig	Inaktiveres ikke ved varmebe-handlingen Konservering (salt, nitrit, organiske syrer, pH) samt lagrings-temperatur skal vælges, så vækst ikke er mulig Især ved salg i tropiske egne (>40°C) kan der være risiko for vækst. Kræver konservering eller kraftigere varmebehandling
Konklusion: Plante proteiner kan tilføje flere sporedannende bakterier og andre arter af sporedannende bakterier end kødråvarer. Varmebehandling til 72°C inaktiverer IKKE disse. Autoklaving (konserves) til 121°C/3 minutter inaktiverer IKKE alle disse.			

Indledning

Formål

I projektet "Nye kombinationer af kød- og planteprotein" produceres en række nye produkter, hvor en væsentlig del af kødet erstattes af planteprotein. Der ønskes en vurdering af, om det påvirker fødevarer sikkerhed og holdbarhed af de produkter, der produceres. Spørgsmålene, der er rejst, er:

- Indeholder produkterne nye pro- og antioxidative komponenter i forhold til traditionelle kødprodukter, hvilket kan påvirke holdbarheden (dette indgår ikke i denne vurdering af mikrobiologisk sikkerhed og holdbarhed)?
- Kan tilsætning af planteprotein introducere nye sporedannende bakterier, som kan påvirke holdbarhed og fødevarer sikkerhed?

Denne vurdering af mikrobiologiske risici skal anvendes til at udarbejde generelle sikkerheds- og holdbarhedsanbefalinger for produktion af produkter med kød- og planteprotein.

Ligeledes skal risikovurderingens anbefalinger indgå i et produktkatalog med beskrivelser af teknologier samt recept- og procesforhold til udvikling af kødprodukter med planteproteiner, herunder produkternes holdbarhed og sikkerhed, sensoriske kvalitet og miljøpåvirkning.

Planteproteiner

I denne rapport fokuseres på planteproteiner fra:

- kartofler
- ærter
- bønner (fx hestebønner (Fababeans))

Dette sammenholdes med proteinkilderne soja og æg, som traditionelt har været anvendt i kødprodukter. Endvidere inddrages aspekter vedrørende brug af krydderier, som også er tørrede produkter, hvor sporedannende bakterier forekommer.

Traditionelt har non-animalsk protein udgjort ca. 2-4% af recepterne. Denne rapport vurderer betydningen af at erstatte 50% af det animalske protein med vegetabilsk protein dvs. tilsætning af op til 10-15% tørret planteproteinkoncentrat.

Fremstilling af planteproteiner (kort resumé)

Ved tørring af grøntsager anvendes processerne sortering, vask, blanchering/varmebehandling og tørring.

Tabel 3 giver en kort oversigt over, hvordan forskellige planteproteiner kan fremstilles. For yderligere detaljer henvises til notat af Hofer (2020)¹⁹⁾. Heraf ses, at den anvendte lufttemperatur er ca. 70-80°C under tørringen.

Ved blanchering (med vand) fås en god reduktion af vegetative bakterieceller, men processen har begrænset/ingen effekt på sporer.

Tørring gennemføres ofte med varm luft. Ved tørringen fordamper vandet, og temperaturen i produktet er ofte omkring 50°C. Derfor er der ingen effekt på varmeinaktivering, selvom luftens temperatur er over 80°C²⁾.

Ved tørring af grøntsager opnås ofte en vandaktivitet lavere end 0,6³⁾.

En vandaktivitet på under 0,6 ses i fødevarer som tørret pasta, krydderier, kiks, tørret mælk, tørrede æg, tørrede grøntsager, mel og kaffe.

Ved en vandaktivitet under 0,6 er der ikke risiko for mikrobiel vækst³⁾, men bakterier og især sporer kan overleve under lagringen.

Table 3. Oversigt over procesbetingelser for produktion af planteproteinprodukter

Produkt	Procestrin	Tilsættes vand eller kemikalier i proces	Temperaturer under proces (maks.)	pH i færdigt produkt	Tørstof i produkt
Sojamel	Defattening	Hexan	Damp	?	88-94%
Sojaprotein-koncentrat	Extraction Spraytørring	Alkohol	80°C	?	90-96%
Sojaprotein-isolat	Basisk ekstraktion Isoelektrisk fældning Neutralisering Spraytørring	NaOH HCl Vand	80°C	?	95%
Ærteprotein-koncentrat	Air classification	Nej	Kold	?	90-91%
Ærteprotein-isolat	Basisk ekstraktion (hydrocyclones) Isoelektrisk fældning Spraytørring	NaOH H ₃ PO ₄ Vand	80°C	?	90%
Kartoffelprotein	Metode 1. Syreekstraktion med varmebehandling Metode 2. Separation ved pH-justeringer	Ja, uvist hvilke.	75-85°C Eller kold	3-7	89%
Hestebønneproteinkoncentrat	Air classification	Nej	Kold	?	87,8%
Hestebønneproteinisolat	Ekstraktion med syre og varmebehandling Spraytørring	Ja, uvist hvilke.	80°C	?	93,9%
Tekstureret ærteprotein	Ekstrudering Tørring	Vand, olie, evt. krydderi	140°C 135°C 10min		95%

Mikrobiologi i tørrede grøntsager

- Mikrobiologi* I denne rapport vurderes humanpatogene:
- bakterier (vegetative, fx salmonella, listeria, E. coli)
 - sporer (Bacillus og Clostridium)
 - skimmel (mykotoksiner)
 - parasitter
 - virus

samt i det omfang, det er muligt, fordævelsesorganismer. I litteraturen er holdbarhedsforringende bakterier dog ikke undersøgt i samme omfang som humanpatogene bakterier.

Generelt om bakterier og sporer i tørrede grøntsager Ved tørring af grøntsager anvendes processerne sortering, vask, blanchering/varmebehandling og tørring.

Ved blanchering fås en god reduktion af vegetative bakterieceller, men processen har begrænset/ingen effekt på sporer. Tørring gennemføres ofte med varm luft. Ved tørringen fordampes vandet, og temperaturen i produktet er ofte omkring 50°C, hvilket ikke inaktiverer bakterier, selvom luftens temperatur er over 80°C²⁾.

Generelt er der stor variation i, hvor mange mikroorganismer der findes på tørrede grøntsager. Aerobt kimaltal udgør 0-10⁸ CFU/g, hvor den mest almindelige forekomst er 10⁴-10⁶ CFU/g. Derudover er det også almindeligt at finde bacillus og clostridiesporer i tørrede grøntsager²⁾. Processen eliminerer således ikke indholdet af bakterier, og indholdet er et resultat af forekomst på råvarer, forekomst i procesudstyr samt lagringen²⁾.

Forekomst af vegetative bakterieceller vurderes at være sammenligneligt med det, der kan findes i rå grøntsager. Se bilag 1 for data fra Lund et al. (2005)²⁾.

Bacillus cereus kan findes i niveauer fra ikke-påvist (<100 cfu/g) til ca. 10⁴ cfu/g (tabel 4).

Clostridium perfringens kan findes i niveauer fra ikke-påvist (<10-100 cfu/g) til ca. 10⁴ cfu/g (tabel 5).

Clostridium botulinum forekommer med en prævalens på 0%-67%. Niveauet er ikke oplyst, men det er sandsynligvis lavt (tabel 5).

Tabel 4. Fund af *Bacillus cereus* (CFU/g) i tørrede vegetabilier

CFU/g	<i>Bacillus cereus</i>	
	Forekomst (%)	Antal (CFU/g)
Tørrede kartofler	40% (n=20) ¹⁾	$1 \times 10^2 - 4 \times 10^3$ ¹⁾
	10% (n=50) ¹⁾	$5 \times 10^1 - 2 \times 10^2$ ¹⁾
	16% (n=50) ¹⁾	> 100 CFU/g ¹⁾ max: 370 CFU/g
Røde linser	75% (n=8) ¹⁰⁾	$1 \times 10^2 - 4,5 \times 10^4$ ¹⁰⁾
Brune linser	100% (n=1) ¹⁰⁾	2×10^2 ¹⁰⁾
Gule ærter	50% (n=4) ¹⁰⁾	$2 \times 10^2, 3 \times 10^2$ ¹⁰⁾
Grønne ærter	33% (n=3) ¹⁰⁾	3×10^3 ¹⁰⁾
Sorte bønner	100% (n=1) ¹⁰⁾	6×10^4 ¹⁰⁾
Kidney beans	67% (n=3) ¹⁰⁾	$1 \times 10^3, 5 \times 10^3$ ¹⁰⁾
Mung beans	0% (n=3) ¹⁰⁾	$< 1 \times 10^2$ ¹⁰⁾
Sojabønner	100% (n=2) ¹⁰⁾	$1 \times 10^2, 2 \times 10^2$ ¹⁰⁾
Ris	60% (n=5) ¹⁰⁾	$1 \times 10^2 - 3 \times 10^3$ ¹⁰⁾
Byggryn/perlegryn	75% (n=8) ¹⁰⁾	$1 \times 10^2 - 4,5 \times 10^4$ ¹⁰⁾
Mel	100% (n=2) ¹⁰⁾	$5 \times 10^2, 2 \times 10^4$ ¹⁰⁾
Suppemix	4,5% (n=22) ⁹⁾	700 ⁹⁾
Gravy mix	8,7% (n=23) ⁹⁾	100-1000 ⁹⁾
Krydderier	40% (n=25) ⁹⁾	100-1000 ⁹⁾
Krydderiblanding	55% (n=20) ⁹⁾	100-1200 ⁹⁾
Skummetmælkspulver	37,5% (n=8) ⁹⁾	200-600 ⁹⁾

^{1), 9), 10):} tal, som angiver reference.

Tabel 5. Fund af Clostridier i vegetabilier og krydderier

<i>Clostridium botulinum</i>		<i>Clostridium perfringens</i>		
Produkt	Forekomst (%)	Produkt	Forekomst (%)	Antal (cfu/g)
Kartofler	67% (n=40) ¹⁴⁾ 0% (n=50) ¹⁴⁾			
Frugt og grønt	19% (n=189) ¹⁴⁾ 13% (n=431) ¹⁴⁾	Fersk frugt og grønt	4% (n=52) ¹⁵⁾	10-140 cfu/g ¹⁵⁾
Grøntsager og krydderier	43% (n=30) ¹⁴⁾	Krydderier	5% (n=60) ¹⁵⁾ 59% (n=147) ¹⁵⁾	10-30 cfu/g ¹⁵⁾ 10 ² -10 ⁴ cfu/g ¹⁵⁾
Grøntsager	4% (n=296) ¹⁴⁾	Saucer, dressinger	54% (n=13) ¹⁵⁾ 12% (n=8)	-
Løg	7% (n=75) ¹⁴⁾			

^{14), 15):} tal, som angiver reference.

Generelt om parasitter i tørrede Kontaminering af fødevarer med parasitter er primært relateret til dårlig hygiejne, fx fækal forurening via vanding med forurennet vand eller dårlig hygiejne under fremstilling.

grøntsager Det er derfor vigtigt at sikre god hygiejne under dyrkning af grøntsager, høst samt produktion. Herved hindres, at produkterne kontamineres med parasitter. Der skal anvendes rent vand, og syge personer må ikke være involveret i produktionen.

Parasitter inaktiveres ved varmebehandling (70°C/2 minutter) og frysning.

Parasitter opformerer ikke i fødevarer.

Generelt om virus i tørrede grøntsager Virus er ikke rigtige levende organismer. De kan ikke opformerer i fødevarer. Opformering sker kun i en værtscelle. Hepatitisvirus opformerer fx kun i leverceller, norovirus opformerer i tarmceller, og bakterievirus (bakteriofager) opformerer kun i specifikke bakterier.

Virus kan overleve længe uden for sin vært. Der er begrænset viden om, hvor længe virus overlever.

Det er derfor vigtigt, at god hygiejne under dyrkning af grøntsager samt produktion hindrer, at produkterne kontamineres med fx norovirus (Roskildesygge) eller andre virus. Der skal anvendes rent vand, og syge personer må ikke være involveret i produktionen.

Virus inaktiveres ved varmebehandling, men forskellige virus kræver forskellige kombinationer af tid/temperatur for at inaktiveres. Norovirus inaktiveres fx ved 100°C, men ikke ved 60°C i 30 minutter⁴).

Generelt om skimmel og mykotoksiner i tørrede grøntsager Skimmel kan vokse ved lavere vandaktivitet end bakterier. Under tørreprocessen kan der være risiko for vækst af skimmel. Skimmelvækst kan være ledsaget af produktion af mykotoksiner. Mykotoksiner er den overordnede betegnelse for de toksiner, som skimmel kan danne under vækst. Det er hovedsageligt *Aspergillus*, *Penicillium* og *Fusarium*, som danner mykotoksiner i fødevarer. Mykotoksiner er uønskede i fødevarer, da de kan være sundhedsskadelige. Langt fra alle mykotoksiner er reguleret via grænseværdier. I det følgende listes de mykotoksiner, der er reguleret i EU. Grænseværdierne for mykotoksiner er reguleret af Commission Regulation (EC) No. 1881/2006²⁰).

For mykotoksiner gælder følgende grænseværdier:

- Aflatoxin (varierer mellem 4 µg/kg og 15 µg/kg). Grænseværdierne dækker produkter som nødder, mandler, tørret frugt, korn, ris, krydderier, majs, mælk samt forarbejdede fødevarer med cerealier
- Patulin (varierer mellem 10 µg/kg og 50 µg/kg). Grænseværdierne gælder produkter som frugt og æblejuice
- Ochratoxin (varierer mellem 0,5 µg/kg og 20 µg/kg). Grænseværdierne dækker korn og produkter fremstillet af korn, druer, kaffe, vin samt krydderier
- Zearalenone (varierer mellem 50 µg/kg og 400 µg/kg) Grænseværdierne gælder for produkter som korn, majs, brød
- Fumonisin (varierer mellem 200 µg/kg og 4.000 µg/kg). Grænseværdierne gælder majs og produkter produceret af majs
- Deoxynivalenol (varierer mellem 200 µg/kg og 1.750 µg/kg). Grænseværdierne gælder hvede, pasta, korn, majs, brød

For detaljer henvises til Commission Regulation (EC) No 1881/2006²⁰.

Det anbefales derfor at være opmærksom på, at leverandørerne af planteprotein har en proces, som sikrer mod skimmelvækst. Opmærksomheden bør være rettet mod aflatoxin og ochratoxin samt zearaleone, fumonisiner og deoxynivalenol, dersom der anvendes majs- og kornprodukter.

Mykotoxiner er meget varmem stabile og svære at nedbryde, hvorfor vækst og toksinproduktion skal hindres i produkter og råvarer⁵.

Kartoffelpulver

Produktkarakteristika Kartoffelflager har et vandindhold på 5-8% ($a_w = 0,3$). I sådanne produkter er der ingen mikrobiel vækst¹.

Fremstilling af kartoffelpulver Kartoffelpulver fremstilles med følgende procestrin:

- kartoflerne vaskes, skrælles og skæres i stykker (ca. 78% vand)
- kartoflerne koges (71-74°C i 20 minutter)
- moses (na-bisulfit; svovldioxid, undgå misfarvning)
- tørring (til flager på en opvarmet tromle)
- pakkes med nitrogen og lav ilt-rest (3,5%)
- opbevares ved stuetemperatur

Bakteriologi Den mikrobiologiske flora i kartoffelflager vil variere og afspejle de miljøforhold, kartoflerne har været dyrket under, samt høst, håndtering og forarbejdning.

Varmebehandling til 71-74°C inaktiverer vegetative bakterieceller og parasitter. Sporer fra sporedannende bakterier som *Bacillus* spp. og *Clostridium* spp. kan overleve varmebehandlingen. Trods dette er det ikke kun de sporedannende bakterier, der kan isoleres fra kartoffelflager. Der er fx fundet: *B. cereus*, *E. coli* og andre coliforme, *S. aureus*, gær og skimmel¹.

Typiske mikrobiologiske krav til kartoffelflager kan være¹:

- totalkim: maks. 10.000 CFU/g
- coliforme: maks. 10 CFU/g
- *E. coli*; *S. aureus*, salmonella: fravær

En amerikansk undersøgelse af tørret kartoffelpulver (n=1500) viste følgende data:

- Aerobt totalkim:
middel $1,1 \times 10^3$ CFU/g (interval: $<100-1,3 \times 10^5$ CFU/g)
47% var under 1×10^3 CFU/g og 8% var over 1×10^4 CFU/g

Anbefalinger til mikrobiologiske grænseværdier Der findes flere forskellige guidelines for mikrobiologisk forekomst i tørrede grøntsager.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods)

E. coli: n = 5, c = 2, m = 100, M = 1000

Fransk komité

- *Salmonella*: fravær i 25 g
- Hygiejneindikatorer: *B. cereus*, koagulasepositive stafylokokker samt sulfitreducerende clostridier.

Ærteprotein

Der er ikke fundet litteratur om mikrobiologi i ærteprotein.

Bønneprotein (hestebønner, fababeans, *Vicia-faba*)

Der er ikke fundet litteratur om mikrobiologi i bønneprotein.

Konklusion mikrobiologi i tørret planteprotein

Ovenstående gennemgang af fund af bakterier i tørrede vegetabilier samt i planteprotein (begrænset data) viser, at produkterne vil have et bakterieindhold på niveau med ferske vegetabiliske råvarer samt sporer fra både bacillus og clostridier.

Den mikrobiologiske belastning vil afspejle produktionshygiejne ved dyrkning af grøntsagerne, produktionshygiejne under tørring m.v. samt lagringsforholdene.

Ved anvendelse af planteprotein er det derfor vigtigt, at proteinet, som anvendes, er sikret mod kritisk forekomst af mikroorganismer, og at de produkter, som det anvendes i, er sikret mod vækst under lagring af produktet. Det sikres ved korrekt varmebehandling og/eller tilsætning af konservering (salt, organiske syrer, nitrit). Valg af varmebehandling og konservering baseres på krav til færdigvarens holdbarhedstid og opbevaringstemperatur.

Anvendelse af planteprotein

Planteproteiner skal tilsættes traditionelle varmebehandlede kødprodukter. Følgende anvendelser vurderes i det følgende:

- Opvarmning til mindst 70°C/2 minutter (kernetemperatur)
- Opvarmning til 121°C/3 minutter (konserves)

Varmebehandling Varmebehandling, hvor kødet opvarmes til 70°C/2 minutter eller 121°C/3 minutter, sikrer, at alle vegetative bakterieceller inaktiveres med mindst 7 log cfu/g.

Derimod kan sporer i varierende grad overleve.

Ved varmebehandling til 70°C/2 minutter inaktiveres sporer ikke.

Ved varmebehandling til 121°C/3 minutter inaktiveres humanpatogene sporer fra *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* og *Bacillus cereus*. Dog viser beregningerne i tabel 6, at de allermest varmeresistente varianter af *C. perfringens* kun inaktiveres ganske lidt ved en holdetid på 3 minutter ved 121°C.

I hvilket omfang ikke-patogene sporer fra mesofile og termofile bacillus samt clostridiearter overlever, er der ikke meget viden om. Men det vides, at der blandt begge slægter er arter, som let overlever 121°C i 3 minutter. Et eksempel er *Bacillus stearothermophilus* med $D_{121^{\circ}\text{C}}$ -værdier på 2,5-14 minutter eller *Clostridium thermosaccharolyticum* med $D_{121^{\circ}\text{C}}$ -værdier på 3,4-16 minutter¹⁸⁾. Sporer af disse bakterier vil ikke inaktiveres væsentligt ved en varmebehandling ved 121°C/3 minutter.

For at hindre spiring og vækst er det derfor nødvendigt at fastlægge holdbarheden ud fra en kombineret effekt af lavt sporeindhold i råvarer, varmebehandling samt konservering og lagringstemperatur.

Bacillus stearothermophilus er bl.a. kendt for at forårsage flat-souring (syredannelse men uden luftproduktion) i konserver. Den nedbryder kulhydrater under syredannelse, dvs. at produktets pH sænkes. Der sker ingen luftdannelse, så konserveredåserne bomberer ikke. Indholdet kan få en medicinagtig lugt og smag. Bakterien kan tilføres via tilsætningsstoffer som fx stivelse¹⁸⁾. Det vurderes derfor, at denne bakterie muligvis også kan tilføres via andre vegetabiliske ingredienser fx planteproteiner. Bakterien er aerob, så spoilage kræver, at der er lidt ilt tilbage i dåsen.

Clostridium thermosaccharolyticum er kulhydratforgærende og producerer syre samt store mængder kuldioxid og hydrogen, der resulterer i bombage samt en lugt af smørsyre. *C. thermosaccharolyticum* vokser ikke ved under 30°C. Derfor vil denne art kunne udgøre et problem i konserver som sælges til lande med højere opbevaringstemperaturer, end dem der er i Danmark. En anden fordærver, som kan overleve varmebehandlingen, er *Clostridium nigrificans*, den danner hydrogensulfid.

Table 6. Inaktivering af sporer ved varmebehandling til 121°C/3 minutter. Kun holdetiden er anvendt i beregningerne.

Bakterie	D-værdi (minutter).	Z-værdi (°C)	Log reduktion (121°C/3 minutter) ¹⁶⁾
<i>C. botulinum</i>	D _{90°C} = 0,9 ^{15) b)}	- a)	>1000
<i>C. botulinum</i>	D _{90°C} = 20 ^{15) b)}	- a)	188,8
<i>C. botulinum</i> proteolytisk (middel)	D _{120°C} = 0,17 ¹⁷⁾	- a)	22,2
<i>C. botulinum</i> proteolytisk (95% PI)	D _{120°C} = 0,48 ¹⁷⁾	- a)	7,9
<i>C. perfringens</i>	D _{105°C} = 3,0 ^{12) b)} D _{120°C} = 0,52 ^{12) b)}	- a)	39,8 7,6
<i>C. perfringens</i>	D _{90°C} = 21,66 ^{12) b)} D _{100°C} = 1,67 ^{12) b)}	- a)	174,4 226,2
<i>C. perfringens</i>	D _{90°C} = 43,33 ^{12) b)} D _{100°C} = 3 ^{12) b)}	- a)	87,2 125,9
<i>C. perfringens</i> (middel)	D _{120°C} = 0,3 ¹⁷⁾	- a)	12,6
<i>C. perfringens</i> (95% PI)	D _{120°C} = 2,7 ¹⁷⁾	- a)	1,4
<i>B. cereus</i>	D _{90°C} = 0,7-2,4 ¹³⁾	- a)	>1000
<i>B. cereus</i>	D _{90°C} = 3,3-5,9 ¹³⁾	- a)	>1000
<i>B. cereus</i> (middel)	D _{120°C} = 0,04 ¹⁷⁾	- a)	94,4
<i>B. cereus</i> (95% PI)	D _{120°C} = 0,52 ¹⁷⁾	- a)	7,6

¹⁵⁾ se detaljer i bilag 3

^{12), 13), 16), 17):} tal, som angiver reference

a) z-værdien 10 er anvendt ved beregningen

b) Lysozym anvendt ved bestemmelse

Opbevaring på køl (<8°C) Varmebehandling til 72°C/2 minutter inaktiverer alle vegetative bakterieceller. Stort set alle sporer overlever. Produkterne skal derfor tilsættes konservering, så vækst af patogene sporer (*C. botulinum* og *B. cereus*) hindres. *C. perfringens* kan ikke vokse ved 15°C.

Ved brug af prædiktive modeller (fx CombasePredictor) kan vækst af patogene bakterier beregnes. I modellen DMRI Predict kan vækst/ikke vækst af *C. botulinum* beregnes.

Opbevaring ved stuetemperatur Varmebehandling til 121°C/3 minutter inaktiverer alle vegetative bakterieceller, sporer fra de patogene arter *C. botulinum* og *B. cereus* samt langt de fleste *C. perfringens*. Nogle af de aller mest varmeresistente stammer af *C. perfringens* inaktiveres ikke.

Ved brug af prædiktive modeller (fx CombasePredictor) kan vækst af patogene bakterier beregnes. Modellerne medtager dog kun parametrene temperatur, pH og salt.

Der findes ingen prædiktive modeller for vækst af fordævelsessporer i konserves, så umiddelbart er der kun erfaring fra holdbarhed af tilsvarende dåsekonserves samt de simple modeller fra CombasePredictor til fastlæggelse af holdbarhed.

Sammenligning af mikrobiologi i planteprotein med fund i kød, æggepulver og krydderier

Da der ikke er fundet litteratur, som specifikt undersøger holdbarheden af kødprodukter efter tilsætning af op til 10-15% planteprotein, forsøges det at sammenholde, hvad den øgede tilsætning betyder i forhold til, at der i dag allerede anvendes sojamel og krydderier, som kan indeholde sporer og et højt aerobt kimal.

Æg *B. cereus* kan overleve fremstilling af æggepulver. Ligeledes kan vegetative celler også overleve spraytørringen af et æggepulver.

Ifølge mikrobiologiforordningen er fødevarer sikkerhedskriteriet for æg og produkter af æg: salmonella. Proceshygiejne kriteriet for ægprodukter er: Enterobacter med $m = 10$ og $M = 100$ cfu/g ($n=5$, $c=2$). Kriteriet for at vurdere proceshygiejne er bl.a. varmebehandling. <https://www.foedevarestyrelsen.dk/Selvbetjening/Vejledninger/Mikrobiologivejledning/Documents/mikrobiologiforordningen.pdf>

Ved søgning af litteratur er der ikke fundet artikler, som beskriver, hvilke og hvor mange bakterier der kan findes i tørrede æggeprodukter.

Kødråvarer – analyser på DMRI I en screening af 14 forskellige kødråvarer blev der fundet **aerobe sporedannere** (vækst ved 37°C) i 4 af de undersøgte kødråvarer. Niveauet var på 1-1,4 log cfu/g. I de øvrige produkter var der < 1 log aerobe sporer/g. I 2 produkter blev der fundet **anaerobe sporer** (vækst ved 37°C), og i det ene produkt (lever) var antallet på 4,8 log cfu/g. I de øvrige 12 produkter var der <1 log anaerobe sporer/g⁶.

I yderligere en screening af 7 kødråvarer blev der fundet 2,2 log **aerobe sporer/g** i et produkt. I alle de andre var niveauet af aerobe sporer < 1 log cfu/g. Der blev ikke fundet **anaerobe sporer** (niveau: < 1 log cfu/g)⁷.

I litteraturen kan der også findes opgørelse af forekomst af patogene sporedannere i fersk kød. Et uddrag er vist i tabel 7. Heraf ses, at *Clostridium perfringens* forekommer ofte i kød, men i lavt antal.

Tabel 7. *Clostridium perfringens* i fersk kød

Produkt	<i>C. perfringens</i>	
	Prævalens (%)	Antal (cfu/g)
Kalv	82% (n = 17) ¹²⁾	1-100 ¹²⁾
Okse	70% (n = 50) ¹²⁾	1-100 ¹²⁾
Kylling	58% (n = 26) ¹²⁾	1-100 ¹²⁾
Gris	52% (n = 27) ¹²⁾	1-100 ¹²⁾
Kød, fisk, fjerkræ	16% (n = 122) ¹²⁾	1-100 ¹²⁾
Hakket oksekød	56% (n = 150) ¹²⁾	55 ¹²⁾
	47% (n = 95) ¹²⁾	5-100 ¹²⁾

¹²⁾: angiver reference

Tabel 8. *Clostridium botulinum* i fersk kød

Produkt	<i>C. botulinum</i>	
	prævalens (%)	antal (cfu/g)
Gris, kylling, okse	0,04% (n = 2358) ¹¹⁾	-
Gris	0% (n = 280) ¹¹⁾	-

¹¹⁾: angiver reference

Indholdet af sporedannende bakterier på fersk kød varierer. Af L&F's hazardmateriale²¹⁾ fremgår følgende forekomst af patogene sporedannere i kød:

B. cereus

Kød og kødprodukter:

- Råt kød: 10^1 - 10^2 cfu/g
- Hamburger: 10^1 - 10^3 cfu/g

I fersk kød af forskellige dyrearter (okse, svin, kylling, lam) blev der i 2 forskellige undersøgelser fundet henholdsvis 6 prøver positive for *B. cereus* ud af 452 analyserede prøver samt 3 positive prøver ud af 133 analyserede, dvs. en forekomst på henholdsvis 1,3% og 1,5% (lav). Antallet af *B. cereus* var 10^1 - 10^3 cfu/g.

C. botulinum

Forekomsten i fersk kød er ukendt, men formodes at være lav.

En fransk undersøgelse af 143 kød- og fjerkræprøver viste, at 12 indeholdt *C. botulinum*. Med en MPN-metode blev det vist, at kimtallet var meget lavt mellem 1 og 3 pr. kg⁸⁾.

I to engelske undersøgelser af fersk grisekød blev der ikke fundet *C. botulinum* i 280 prøver. I 3 andre studier blev der fundet en forekomst på mellem 2% og 14%. I de positive prøver udgjorde antallet af *C. botulinum* op til 5 sporer/kg.

C. perfringens

Ukendt forekomst i dansk kød.

Internationale studier viser, at forekomsten af *C. perfringens* på slagtekroppe af ko, gris og lam kan være hhv. 29%, 66% og 85% i et niveau på 20 cfu/100 cm².

De internationale studier viser følgende forekomst i fersk oksekød: 47% (5-100 cfu/g), 56% (middel forekomst: 55 cfu/g).

På kalv, okse, kylling og gris var forekomsten hhv. 82%, 70%, 58% og 52% i et antal på 1-100 cfu/g.

Krydderier En screening af 8 krydderier viste et indhold af aerobe sporer på 1-4,4 log cfu/g og et indhold af anaerobe sporer på <1-3,3 log cfu/g, se tabel 9⁷⁾.

Indholdet af sporer i krydderier er således sammenligneligt med indholdet af sporer i tørrede grøntsager.

Tabel 9. Aerobt sporetal (BA, 37°C) og anaerobt sporetal (SFP, 37°C) (log cfu/g)

Prøve	aerobt	anaerobt
1. Hvidløgpulver	3,6	< 1
2. Tørret blodplasma	3,0	< 1
3. Tørret løg	4,0	1,7
4. Tørret champignon	2,6	< 1
5. Kartoffelstivelse	1,3	< 1
6. Salvie fintskåret	4,1	2,1
7. Krydderiblanding	4,4	< 1
8. Peber hvidt stødt	1,0	3,3

I en screening af sporeindhold i frugt, grøntsager og krydderier blev der i frugten fundet 1-2 log aerobe hhv. anaerobe sporer/g. I grøntsagerne blev der fundet fra <1 til 5 log aerobe sporer/g og fra <1 til 4 log anaerobe sporer/g. I krydderurter blev der fundet 3-6 log aerobe sporer/g og 2-4 log anaerobe sporer/g. Der blev fundet *B. cereus* og sulfitreducerende clostridier i både krydderurter og grøntsager.

For detaljer om fund i de undersøgte grøntsager og krydderier henvises til bilag 2.

Grøntsager Choma et al. (2000)¹³⁾ fandt *B. cereus*-lignende stammer i et niveau på <10 cfu/g i 20% af frisk fremstillede grønsagspuréer af broccoli, gulerod, courgette, kartoffel og gule ærter (split peas). Under lagring ved 4°C var der ingen vækst, mens vækst blev observeret ved 10°C¹³⁾.

Diskussion

Parasitter og virus God hygiejne under dyrkning af grøntsager, under høst og transport samt under forædling/produktion hindrer, at produkterne kontamineres med parasitter og virus. Der skal anvendes rent vand, og syge personer må ikke være involveret i produktionen.

Parasitter inaktiveres ved varmebehandling (70°C/2 minutter) og frysning. Nogle virus kan kræve op til 100°C for inaktivering.

Parasitter og virus opformerer ikke i fødevarer.

Skimmeltoksiner Skimmeltoksiner dannes under vækst af skimmel på planter eller under tørring og lagring. Toksinerne er varmostabile. Derfor skal der stilles krav til det maksimale indhold af bestemte skimmeltoksiner. Grænseværdier er reguleret af EU. Og de fremgår af Commission Regulation (EC) No 1881/2006²⁰.

Målet er at erstatte kødprotein med vegetabilsk protein. Det betyder, at der ønskes tilsat 10-15% tørret planteprotein af fx kartofler, ærter eller bønner.

Sporer fra kød Kød har generelt en lav prævalens af *B. cereus*, og antallet er lavt <1.000 CFU/g. Kød har en lav prævalens af *C. botulinum* 0-14%, og niveauet er lavt; få sporer pr. kg kød. Kød har en hyppigere forekomst (30-80%) af *C. perfringens*, men niveauet er lavt, typisk under 100 CFU/g.

Indholdet af sporer i kød er lavere end i vegetabilier og krydderier.

Sporer fra krydderier I dag anvendes krydderier til varmebehandlede kødprodukter. Krydderier tilsættes ofte i en koncentration på ca. 1%. Krydderier kan have et indhold af aerobe sporer på 1-4,4 log cfu/g (nogle op til 6 log cfu/g) og et indhold af anaerobe sporer på <1-3,3 log cfu/g (nogle op til 4 log cfu/g).

Ved at tilsætte ca. 1% af sådanne krydderier tilføres produktet op til ca. 2-4 log aerobe sporer/g færdigprodukt, og for de anaerobe sporer tilføres ca. 1-2 log cfu/g færdigprodukt.

Sporer fra vegetabilier Tørrede vegetabiliske produkter (bilag 2) kan have et indhold af *B. cereus* på op til 4-5 log cfu/g. I frosne grønsager er indhold af aerobe sporer på 4-5 log cfu/g, og indholdet af anaerobe sporer er på 3-4 log cfu/g. Mindst samme niveau vil forventes i tørrede grøntsager, idet tørreprocessen ikke reducerer antallet af bakterier væsentligt.

Ved at tilsætte 10-15% af de tørrede vegetabilier vil produktet tilføres ca. 3-4 log aerobe sporer og 2-3 log anaerobe sporer.

Tilsætning af 10-15% planteprotein kan således tilføre lidt flere sporer, end der fås ved tilsætning af 1% krydderier. Og de tørrede planteproteiner vil bidrage med et større sporetal, end der er i det kød, de erstatter.

Derfor skal varmebehandlingen, konserveringen og holdbarheden afpasses efter dette let øgede tryk med sporer og vegetative bakterier.

Pasteuriserede kødprodukter I produkter varmebehandlet til 72°C/2 minutter inaktiveres alle vegetative bakterieceller, men der sker ingen reduktion af sporer. Det vurderes, at de sporer, der i dag tilføres via krydderier, vil være sammenlignelige med de sporer, der tilføres med de nye planteproteiner om end i et lidt højere antal. Det er derfor overvejende sandsynligt, at køleopbeva-

ringen sammenholdt med konservering med salt, nitrit og organiske syrer vil give samme holdbarhed. Holdbarheden af slicede kølede kødprodukter er i dag primært begrænset af kontaminering i forbindelse med slicing og pakning, og de dominerende fordævelsesorganismer er mælkesyrebakterier fx *Leuconostoc* spp. I forhold til fødevarerikkerhed, dvs. styring af *B. cereus*, *C. perfringens* og *C. botulinum* er der ingen ændret udfordring ved brug af planteproteiner i forhold til brug af krydderier. Væksten skal styres ved tilsætning af konservering og opbevaring ved lav temperatur, uanset om der tilføres 1, 10 eller 100 sporer.

Kødkon- I produkter varmebehandlet til 121°C/3 minutter inaktiveres alle vegetative bakterieceller
serves og en stor del af de sporedannende bakterier.

I forhold til fødevarerikkerhed, dvs. styring af *B. cereus*, *C. perfringens* og *C. botulinum*, er der ingen ændret udfordring ved brug af planteproteiner i forhold til brug af krydderier. De humanpatogene sporedannere vil inaktiveres ved varmebehandling til 121°C/3 minutter.

I forhold til holdbarhed (mikrobielt fordærv) af konserves kan der være udfordringer med termofile sporedannere. Dette vil dog sandsynligvis primært være i forhold til holdbarhed af konserves, som skal distribueres ved varmere temperaturer end dem, der er i Danmark. I disse produkter kan det blive nødvendigt med en kraftigere varmebehandling end 121°C/3 minutter.

Alternativt kan der stilles krav til leverandørerne af planteproteiner om forekomst af aerob og anaerobe sporer i pulveret. Et forslag kan være:

- Aerobe sporer: <10-100 sporer/g
- Anaerobe sporer: <10 sporer/g
- Måske termofil sporeanalyse: <10 sporer/g

Table 10. Mikrobielt fordærv af konserver med pH>4,6²²⁾

Produkter	Bakterier	Fordærv	Vækst/inaktivering
pH >5,3: (flat-sour spoilage)	<i>Geobacillus stea- rothermophilus</i> , <i>Bacillus coagulans</i>	Uklar saft, vakuum-slip, ingen gas Lugt: gammel, sur (ofte: tomat, mælk)	<i>G. stea.</i> : >37°C; 65°C) <i>B. coa.</i> : 25-50°C
pH >4,8 (termofile anaero- rober)	<i>Thermoanaero- bacterium ther- mosaccharolyticum</i> <i>T. sulfurophilus</i>	bombage (CO ₂ , H ₂) Lugt: sur, osteagtig, (ofte: spinat, majs, kød, tomat, grøntsager)	Lagring ved over 35°C <i>T. therm.</i> : D _{121°C} =3-4 minutter
pH >4,8 (sulfid spoilage)	<i>Desulfotomaculum nigrificans</i> <i>Clostridium bifer- mentans</i>	sortfarvning, Lugt: rådne æg, jern- sulfit (ofte: ærter, majs)	
pH >4,8 (putrefactive anaerobes)	<i>Clostridium sporoge- nes</i> , <i>Clostridium put- refaciens</i> , <i>Clostri- dium botulinum</i>	bombage Lugt: putrid (ofte: spinat, majs)	
pH >4,8 (aerobe spore- dannere)	<i>Bacillus mesenteri- cus</i> , <i>Bacillus poly- myxa</i> , <i>Bacillus macerans</i>	bombage/vakuumslip syre og gas dannes (ofte rødbeder, mælk, kød, hjemmesyltede produkter)	

Konklusion

Tilsætning af 10-15% planteprotein **kan øge kimtallet (vegetative celler og sporer)** i recep-
ten. Produktet skal derfor varmebehandles samt konserveres, og holdbarheden skal af-
passes efter dette let øgede tryk fra sporer og vegetative bakterier. Der skal stilles krav til
leverandører med fokus på lav forekomst af sporer og skimmel samt fravær af virus, pa-
rasitter og skimmeltoksiner i planteproteinprodukterne, fx gennem leverandøraudit.

Kimtal Det aerobe kimtal kan forventes at være højere end det, der findes i frisk kød. I grøntsager kan der ofte findes 10⁴-10⁶ CFU/g. Reduktion af kimtallet kræver, at grøntsagsingredi-
enserne varmebehandles, og at produktionshygiejnen er høj under tørring, så vækst og
kontaminering undgås.

Sporer Tilsætning af 10-15% planteprotein kan tilføre lidt flere sporer, end der fås ved tilsætning
af 1% krydderier. Og de tørrede planteproteiner vil bidrage med et større sporetal, end
der er i det kød, de erstatter. Derfor skal varmebehandlingen, konserveringen og hold-
barheden afpasses efter dette let øgede tryk med sporer og vegetative bakterier.

Virus og parasitter God hygiejne under dyrkning af grøntsager, under høst og transport samt ved foræd-
ling/produktion hindrer, at produkterne kontamineres med parasitter og virus. Der skal
anvendes rent vand, og syge personer må ikke være involveret i produktionen.

*Skimmel-
toksiner* Der skal stilles krav til leverandørerne om fravær/maksimalt indhold af bestemte skim-
meltoksiner. Grænseværdier er reguleret af EU, og de fremgår af Commission Regulation
(EC) No 1881/2006²⁰⁾.

Pasteurisering I produkter varmebehandlet til 72°C/2 minutter inaktiveres vegetative bakterieceller. Sporer overlever, og vækst af disse skal derfor hindres med konservering og lagringstemperatur. Prædiktiv mikrobiologi kan anvendes til beregning af, hvordan vækst af *C. botulinum* og til dels *B. cereus* hindres. *Clostridium perfringens* vokser ikke i køleopbevarede produkter.

Konserves I produkter varmebehandlet til 121°C/3 minutter inaktiveres alle vegetative bakterieceller og de humanpatogene sporedannere.

I forhold til holdbarhed (mikrobielt fordærv) af konserves kan der være udfordringer med termofile sporedannere. Dette vil dog sandsynligvis primært være i forhold til holdbarhed af konserves, som skal distribueres ved varmere temperaturer, end dem der er i Danmark. I disse produkter kan det blive nødvendigt med en kraftigere varmebehandling end 121°C/3 minutter.

Der er fundet yderst begrænset litteratur om mikrobiologi i tørret planteprotein, samt hvilken konsekvens det har for holdbarhed af kødprodukter.

Referencer

- 1) King, N.J., Whyte, R. & Hudson, A. (2007) Presence and significance of *B. cereus* in dehydrated potato products. *J. Food Protection* 70(2)514-520
- 2) Lund, B.M, Baird-Parker, T.C. & Gould, G.W. (2005). The microbiological safety and quality of food. Vol. 1, chapter 25, page 667.
- 3) Lund, B.M, Baird-Parker, T.C. & Gould, G.W. (2005). The microbiological safety and quality of food. Vol. 1, chapter 7, page 150-157.
- 4) Generisk Hazardanalyse, Landbrug & Fødevarer. Bilag A, Faktablad: Fødevarebårne virus. https://secure.e-smiley.dk/api/public_control_programme.php?deal_id=17511&code=c75672df9f9a9d676dfb9dbf4a81627f&programme=6244&programme_key=c12b0f9251ac616b56037b9903a246f2#ecc_258674
- 5) Generisk Hazardanalyse, Landbrug & Fødevarer. Bilag A, Faktablad: Skimmel. https://secure.e-smiley.dk/api/public_control_programme.php?deal_id=17511&code=c75672df9f9a9d676dfb9dbf4a81627f&programme=6244&programme_key=c12b0f9251ac616b56037b9903a246f2#ecc_258674
- 6) Becker, L. (2004) Screening for sporedannere i kødråvarer fra Danmark og Sverige (projekt 18473, SFDokumenter:25176.1)
- 7) Becker, L. (2004) Screening for sporedannere i krydderier, hjælpestoffer og kødråvarer (projekt 18473, SFDokumenter: 21120.1)
- 8) Koch, A.G. (2006) Screening for antimikrobiel effekt samt mikrobiologisk belastning af frugt, grønt og urter (projekt 18491/18478, SFDokumenter: 27914.1)

- 9) Kim, H.U. & Goepfert, J. M. (1970) Occurrence of *Bacillus cereus* in selected dry food products. *J. Milk Food Technol.* 34:12-15 , 12- 15
- 10) Blakey, L. & Priest, F.G. (1980) The occurrence of *Bacillus cereus* in some dried foods including pulses and cereals. *J. Applied Bacteriology*, 48, 297-302
- 11) Lund, B.M, Baird-Parker, T.C. & Gould, G.W. (2005). The microbiological safety and quality of food. Vol. 2, chapter 41, page 1068-1074.
- 12) Lund, B.M, Baird-Parker, T.C. & Gould, G.W. (2005). The microbiological safety and quality of food. Vol. 2, chapter 42, page 1119-1125.
- 13) Choma, Guinebretiere, Carlin, Schmitt, Velge, Granum & Nguyen-The (2000) Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked foods containing vegetables. *J. Applied Microbiology*, 88, 617-625
- 14) ACM/1322 (2020). ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD ACMSF subgroup on non-proteolytic *Clostridium botulinum* and vacuum and modified atmosphere packaged foods. Final report
- 15) Ewelina Wachnicka, Sandra C. Stringer, Gary C. Barker, Michael W. Peck (2016) Systematic Assessment of Nonproteolytic *Clostridium botulinum* Spores for Heat Resistance. *Applied and Environmental Microbiology*. October. Volume 82 Number 19, 6019-6029.
- 16) DMRI-regneark til beregning af varmeinaktivering.
- 17) van Asselt, E.D. & M.H. Zwietering (2006): A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *Int. J. Food Microbiology* 107, 73-82.
- 18) Bøgh-Sørensen, Højmark Jensen & Zeuthen (1986) *Konserveringsteknik 2*, side 11.23.
- 19) Hofer, L.H. (2020) Procesbeskrivelser for fremstilling af planteprotein. (projekt 2007970, notat 7/7 2020)
- 20) KOMMISSIONENS FORORDNING (EF) Nr. 1881/2006 af 19. december 2006 om fastsættelse af grænseværdier for bestemte forurenende stoffer i fødevarer.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DA/TXT/?uri=CELEX:02006R1881-20150731>
- 21) 5) Generisk Hazardanalyse, Landbrug & Fødevarer. Bilag A, Faktablad: Bakterier.
https://secure.e-smiley.dk/api/public_control_programme.php?deal_id=17511&code=c75672df9f9a9d676dfb9dbf4a81627f&programme=6244&programme_key=c12b0f9251ac616b56037b9903a246f2#ecc_258674
- 22) Spoilage of canned Foods (2016). Kap. 22 i: *Food Microbiology: Principles into practice*. First edition. Osman Erkmen & T. Faruk Bozoglu.

Bakterieforekomst i tørrede grøntsager
(cf. Lund et al. (2005, kapitel 25²))

<i>Microorganisms</i>	<i>Dehydrated Vegetable</i>	<i>Samples Examined</i>	<i>Numbers (cfu g⁻¹)</i>	<i>Reference</i>
Mesophilic, aerobic bacteria	Range	35	10 to 10 ⁷	132
		110	10 ² to > 10 ⁶ , mostly 10 ³ to > 10 ⁶	237
		393	98 % < 10 ⁵	274
		78	<10 ³ to 10 ⁶ , 83 % < 10 ⁵	292
		139	< 10 to 10 ⁷	511
	Onion powder and flakes	243	10 ³ to 10 ⁷	372
	Ground asparagus	89	10 ² to 10 ⁸ , mostly 10 ³ to 10 ⁷	435
Potatoes	119	10 to 10 ⁸ , mostly 10 ² to 10 ⁷	435	
Coliforms	Range	35	< 10 to > 10 ⁶ , 83 % < 10 ³	132
		243	< 1 to > 10 ³	372
		340	< 1 to 10 ⁵ , 91 % < 10 ²	435
		125	< 1 to 10 ⁶ , mostly 1 to 10 ⁵	435
		146	10 to 10 ⁶	512
Enterobacteriaceae	Range	110	< 10 to < 10 ⁵ , 90 % < 10 ³	237
Enterococci	Range	35	< 10 to 10 ⁶ , 86 % < 10 ³	132
Group D Streptococci	Onion powder and flakes	243	< 10 to 10 ⁵	372
Yeasts	Potato sticks	40	98 % < 10 ²	237
	Range	393	98.5% < 10 ³	274
	Potatoes	114	< 1 to 10 ⁶ , mostly 1 to 10 ⁶	435
	Ground asparagus	87	< 1 to 10 ⁸ , mostly 10 ² to 10 ⁷	435
Molds	Potato sticks	40	98 % < 10 ²	237
	Range	393	98.7% < 10 ³	274
	Potatoes	113	< 1 to 10 ³ , 93 % < 10 ²	435
	Ground asparagus	90	< 1 to 10 ⁵ , mostly 10 ² to 10 ⁴	435
Yeasts and molds	Onion powder and flakes	243	10 to 10 ⁴	372

Bakterieforekomst i tørrede grøntsager
(cf. Lund et al. (2005, kapitel 25²))

Table 25-21 Dominant Microorganisms on Dehydrated Vegetables

Microbial Group	Dehydrated Vegetable	Dominant Organisms ^a	Reference
Bacteria	Range	<i>Aerobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i>	511
Enterobacteriaceae	Range	<i>Klebsiella/Enterobacter</i> spp., <i>Proteus/Providencia</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., <i>Escherichia</i> spp.	237
Enterobacteriaceae	Onion	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>Citrobacter</i> spp.	458
Coliforms	Range	<i>Aerobacter</i> spp., <i>E. coli</i>	132
Enterococci	Range	<i>Streptococcus faecium</i> , <i>S. faecalis</i>	132
Aerobic mesophilic spore-forming bacteria	Onion	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. pumilus</i>	458
Molds	African vegetables	<i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> ; <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Penicillium</i> <i>oxalicum</i> , <i>Rhizomucor pusillus</i> , <i>Fusarium equiseti</i>	5
	Mushroom	<i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>	165
	Okra	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.	175, 313
	Range	<i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Spicaria</i> , <i>Sporotrichum</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Herpocladia</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Monilia</i> , <i>Thamnidium</i>	511
Yeasts	Mushroom	<i>Pichia</i> , <i>Hansenula</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Rhodotorula</i>	165

^aThe names listed are those given in the referenced papers.

Table 25-22 Numbers of Pathogenic Bacteria on Dehydrated Vegetables

Bacterium	Dehydrated Vegetable	Samples Examined	Prevalence (% of Samples) and/or Numbers (cfu g ⁻¹)	Reference
<i>Escherichia coli</i>	Range	406	99.8% < 10 ²	274
		78	86% < 10	292
	Onion powder and flakes	243	100% < 10	372
	Ground asparagus and potato	460	< 1 to 10 ⁴ , 97.8% < 10 ²	435
	Onion	146	100% < 1	512
<i>Salmonella</i>	Range	68	2.9% positive (> 1 in 25 g)	80
		70	100% < 1 in 25 g	274
	Mushroom	162	6.8% positive (> 1 in 25 g)	80
	Asparagus	48	22.9% positive (> 1 in 25 g)	80
	Ground asparagus and potato	424	99.5% < 1 in 20 g	435
<i>Staphylococcus aureus</i> ^a	Range	70	100% < 10	274
		78	98.7% < 100	292
	Onion powder and flakes	243	100% < 10	372
	Ground asparagus and potato	166	100% < 10 ²	435
<i>Bacillus cereus</i>	Potatoes	20	40% positive, 10 ² to 4 × 10 ³	277
<i>Clostridium perfringens</i> ^b	Range	464	98.3% < 100	274
		78	97.5% < 2	292
	Onion powder and flakes	243	100% < 10 ²	372
	Ground asparagus and potato	372	98.7% < 10 ² , 100% < 10 ³	435

^aCoagulase-positive Staphylococci.

^bSulfite-reducing Clostridia.

Fund af sporer i grøntsager og krydderier (Koch, 2006⁸⁾)

Mikrobiologisk belastning af grønt

GRØNT	Aerobt kimal	Aerobt sporetal	B. cereus agar	Anaerobt kimal	Anaerobt sporetal	Sulfitreducerende
	BA, 30°C/3 dg	BA, 30°C/3 dg	BC-A, 30°C/3 dg	BA, 30°C/3 dg	BA, 30°C/3 dg	SFP, 30°C/3 dg
Gulerødder tørret #	2,6	2,0	0,5	1,5	2,0	0,5
Persille flad #	3,1	2,0	1,0	1,8	2,0	0,5
Broccoli frost *	3,3	2,5	1,7	3,5	1,3	1,6
Tomater soltørrede #	3,6	2,0	3,0	1,5	0,5	0,5
Hvidløg knust #	3,8	3,4	1,9	3,6	2,6	0,5
Blandet svampe ARDO #	3,9	2,7	1,6	2,5	2,2	1,6
Majs frost *	4,0	1,5	0,5	3,4	1,0	0,5
Gulerødder frost *	4,5	1,5	0,5	3,8	0,5	0,5
Løg kipplede #	4,6	4,8	2,7	3,7	3,4	1,0
Porre frost *	4,9	2,0	1,3	2,6	1,0	0,5
Hvidløgpulver tørret *	4,9	4,8	2,2	4,3	4,3	2,7
Løg frost *	5,3	1,5	1,5	3,9	1,5	2,7
Porre tørret #	5,3	4,4	2,9	4,4	3,6	2,1
Spinat frost *	5,4	2,0	1,0	3,9	2,0	2,4
Champignon frost *	5,4	2,0	3,2	3,7	0,5	1,0
Oliven grønne (glas)	3,3	0,5	1,0	4,3	0,5	0,5
Oliven sorte (glas)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Grønt – min.	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Grønt – maks.	5,4	4,8	3,2	4,4	4,3	2,7
Grønt – middel	4,0	2,4	1,6	3,1	1,7	1,2
Grønt – std.afv.	1,3	1,3	0,9	1,2	1,2	0,9

0,5: Kimtallet er mindre end 10 cfu/g; 1,5: Kimtallet er mindre end 100 cfu/g

Fund af sporer i grøntsager og krydderier (Koch, 2006⁸⁾)

Mikrobiologisk belastning af krydderurter

URTER	Aerobt kimal	Aerobt sporetal	B. cereus agar	Anaerobt kimal	Anaerobt sporetal	Sulfit reducerende
	BA, 30°C/3 dg	BA, 30°C/3 dg	BC-A, 30°C/3	BA, 30°C/3 dg	BA, 30°C/3 dg	SFP, 30°C/3 dg
Purløg tørret ARDO #	4,0	3,0	1,5	2,6	2,0	0,5
Koriander knust #	4,6	3,8	2,8	4,1	2,8	1,9
Persille skåret, tørret *	5,0	4,3	2,0	3,7	3,8	1,8
Oregano skåret #	5,1	4,0	2,5	3,2	2,6	2,6
Chilli knust #	5,1	5,5	4,5	4,3	3,6	1,0
Rosmarin skåret #	5,6	3,3	2,7	4,6	2,3	2,5
Salvie skåret #	5,6	3,7	3,4	4,4	2,5	2,2
Dildspidser tørret *	5,6	4,0	1,9	3,9	3,7	2,1
Basilikum skåret #	6,2	5,7	4,9	4,5	4,1	2,5
Basilikum skåret, tørret *	6,3	6,3	3,0	4,2	4,0	ca. 4-5*
Timian skåret #	7,0	6,0	7,0	3,7	4,0	3,1
Urter - min.	4,0	3,0	1,5	2,6	2,0	0,5
Urter - maks.	7,0	6,3	7,0	4,6	4,1	3,1
Urter - middel	5,5	4,5	3,3	3,9	3,2	2,0
Urter - std.afv.	0,8	1,2	1,6	0,6	0,8	0,8

*) tællelig på -2 fortynding.

D-værdier fra forskellige forsøg samlet af Wachnicka et al. (2016)¹⁵⁾

Følgende figurer er fra artiklen af Wachnicka et al. (2016)¹⁵⁾. Heraf ses, at varmeresistensen af sporer fra *Clostridium botulinum* (psykrotrofe/nonproteolytiske) varierer betydeligt.

Bemærk, at D-værdierne er angivet som log(D). For D-værdien i minutter skal der tages INV log til tallene.

Data viser følgende for D-værdier ved 90°C:

I medier uden lysozym: $D_{90^\circ\text{C}} = 0,6$ minutter

For de varmfølsomme celler i en population (med lysozym): $D_{90^\circ\text{C}} = 0,9$ minutter

For de varmeresistente celler i en population (med lysozym): $D_{90^\circ\text{C}} = 19,5$ minutter

Heat Resistance of Nonproteolytic *C. botulinum* Spores

TABLE 1 Parameters of fitted normal distributions corresponding to reported values of $\log[D(T)]$ (minutes) for spores of nonproteolytic *C. botulinum*^a

T (°C)	-LYS			+LYS HS			+LYS HR		
	n	<Log[D(T)]>	$\sigma_{\log D}$	n	<Log[D(T)]>	$\sigma_{\log D}$	n	<Log[D(T)]>	$\sigma_{\log D}$
70	59	1.35	0.28						
75	66	0.71	0.49	4	1.12	0.30	5	2.18	0.28
80	151	0.16	0.41	9	0.16	0.26	9	1.37	0.64
85	27	0.04	0.60	18	-0.35	0.57	22	1.52	0.38
90	8	-0.24	0.42	40	-0.03	0.21	44	1.29	0.20

^a Values correspond to measurements of the HS and HR fractions of spores in the presence (+LYS) and absence (-LYS) of lysozyme. n is the number of reported values.

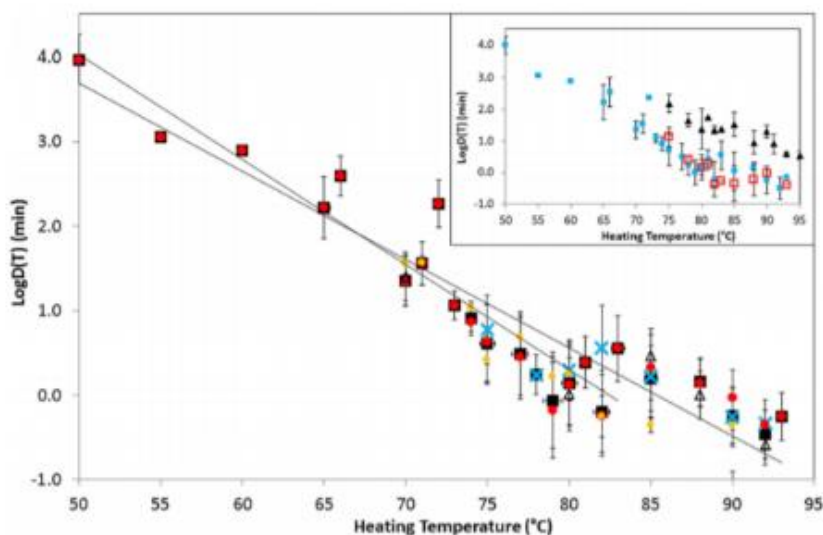


FIG 2 Summary of the heat resistance (D values) of spores of nonproteolytic *C. botulinum* extracted from literature sources. Data points and error bars correspond to the mean and standard deviation of all of the D values measured at a particular experimental temperature in the absence of lysozyme. Black squares correspond to all of the data, and blue crosses, red circles, orange circles, and open triangles correspond to toxin types B, E, and F and mixed toxin types. The solid lines represent the best fit to the experimental data in a temperature range of 50 to 83°C and for the whole data set. The inset compares D values measured in the absence of lysozyme (blue closed squares) and those measured in the presence of lysozyme (HS fraction, red open squares; HR fraction, closed triangles).