

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Fakultet for veterinærmedisin og biovitenskap
Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Masteroppgave 2014
60 stp

Mikrobiologisk og sensorisk holdbarhet av kjøttpålegg under ulike lagringsbetingelser

Microbiological and sensory shelf life on cold
cuts of meat during various storage
temperatures

Madelaine Christina Jansen

Forord

Med denne masteroppgaven avslutter jeg min mastergrad i Mikrobiologi ved Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet (NMBU). Laboratoriet arbeidet ble utført ved NOFIMA, Ås, avdeling for trygg og holdbar mat.

Først og fremst vil jeg takke mine veiledere ved NOFIMA, forsker Even Heir og forsker Trond Møretrø for god oppfølging og veiledning. Jeg setter stor pris på all tid dere har satt av til meg.

Takk til ingeniørene Signe Marie Drømtorp, Merete Rusås Jensen, Anette Åsli og Janina Berg ved NOFIMA for hjelp med laboratoriet arbeidet, og øvrige ved avdelingen for å ha bidratt til et lærerikt og hyggelig år.

En takk rettes også til min hovedveileider ved NMBU, Hilde Marit Østlie, og biveileder Solveig Langsrud ved NOFIMA.

Sist, men ikke minst, vil jeg takke venner og familie for støtte og oppmuntring gjennom året som har gått.

Ås, september 2014

Madelaine Christina Jansen

Sammendrag

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke sammenhengen mellom bakterieflora i produksjonsmiljø og i utvalgte typer varmebehandlet, skivet kjøttpålegg. Målet var å oppnå mer kunnskap om forringere tilstede i produksjonsanlegg som blir overført til produktene i forbindelse med slicing og pakking.

To ulike lagringsforsøk for kjøttpålegg ble gjennomført. I lagringsforsøk 1 ble produktene lagret uåpnet ved 4°C og prøver ble analysert ved ulike lagringstider i forhold til utløpsdato. Lagring uåpnet ved 4°C viste seg å være tilnærmet optimal lagring, da sensoriske analyser ikke påviste forringelse verken ved utløpsdato eller ved lengre tid over utløpsdato. Det ble hovedsakelig påvist melkesyrebakterier fra pålegg i lagringsforsøk 1.

I lagringsforsøk 2 ble betingelsene for lagring endret for å tilsvare en mer realistisk forbrukerhåndtering av produktene. Produktene ble lagret både åpnet og uåpnet, ved 4°C og 8°C. I tillegg ble produktene fra begge lagringstemperaturene inkubert ved 25°C to timer daglig. Dette tilsvarer forskjeller i kjøleskapstemperatur og lagring av pålegg i romtemperatur under et måltid. Både sensoriske og mikrobiologiske analyser viste at endrede lagringsbetingelser hadde betydning for forringelse. I åpnede pakker ble det i tillegg til melkesyrebakterier påvist en andel *Pseudomonas*.

Det ble tatt prøver av overflater ved produksjonslinjene hos to kjøttprodusenter (produsent 1 og 2) etter renhold og under slicing og pakking av kjøttpålegg. Utvalgte kolonier fra dyrkbar analyse av overflatene i produksjonsanleggene og fra kjøttpålegg ble identifisert ved 16S rDNA-sekvensering. Total bakterieflora i kjøttpålegg ble identifisert ved dyrkningsuavhengig analyse, som viste høyere diversitet i kjøttpålegg sammenlignet med dyrkbar analyse.

Genotyping av dominerende bakterier fra produksjonsanlegg og fra pålegg (*Leuconostoc*, *Lactobacillus* og *Pseudomonas*) viste at det i visse tilfeller ble påvist samme bakteriestamme i produksjonsanlegg og i kjøttpålegg.

Det ble påvist ulikheter i bakterieflora mellom produsentene og i påleggstypene. Dette kan være forårsaket av blant annet råvaren, ulikheter i hygienetiltak og produksjonsrutiner.

Abstract

The purpose of this thesis was to investigate the relationship between bacterial flora in the production environment and in selected heat treated cold cuts of meat. The aim was to obtain more knowledge about spoilage bacteria present in production facilities being transferred to the cold cuts during slicing and packaging.

Two different storage experiments were conducted on cold cuts of meat. In storage experiment 1, the products were stored unopened at 4°C and samples were analyzed at different time points in relation to the expiration date. These storage conditions proved to be nearly optimal for storage of cold cuts, as sensory analysis did not observe much difference in sensory qualities in cold cuts at the expiration date or storage beyond the expiration date. It was mainly detected lactic acid bacteria from the cold cuts of meat in the first storage experiment.

In the second storage experiment the conditions of storage were changed to correspond realistic conditions used by the consumers. The cold cuts were stored in opened and closed packages, stored at 4°C and 8°C. In addition, the cold cuts were incubated at 25°C for two hours daily. These storage conditions corresponds to differences in consumers refrigerator temperatures and the temperature the cold cuts are exposed to during a meal. Both sensory and microbiological analyzes revealed that changes in storage conditions were significant for spoilage. In the opened packages lactic acid bacteria in addition to *Pseudomonas* were identified.

Samples were taken of surfaces at production lines at two meat producers (producer 1 and 2) after cleaning and during slicing and packaging of cold cuts. Selected colonies from culturable analysis from surfaces in production facilities and from cold cuts were identified by 16S rDNA sequencing. Total bacterial flora in cold cuts were identified by non-culturable analysis, which showed higher diversity compared to the culturable analysis.

In some cases the same bacterial strain of *Leuconostoc*, *Lactobacillus* and *Pseudomonas* were identified in the production plants and in cold cuts of meats by genotypic fingerprinting.

The results of the experiment indicated that there are differences in bacterial flora between different meat producers and in cold cuts of meat that can be caused by the raw material, hygiene and production routines.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
1 Innledning	1
2 Teori	3
2.1 Spiseklare kjøttprodukter	3
2.2 Forringelse av varmebehandlet kjøttpålegg	3
2.2.1 Kjøttets egenskaper	4
2.2.2 Interaksjoner mellom bakterier i kjøttpålegg	5
2.2.3 Forringere på kjøttpålegg	5
2.2.4 Bakteriefloa blir påvirket av pakkemetode	8
2.2.5 Patogene matbårne bakterier	9
2.3 Produksjon av kjøttpålegg – fra slakt til pålegg	10
2.3.1 Tilsetningsstoffer	11
2.3.2 Bakterier i produksjonsanlegg	13
2.3.3 Hygienetiltak i produksjonsanlegg	13
2.4 Forbrukeransvar	14
3 Materialer og metoder	15
3.1 Produsenter og produkter	15
3.2 Prøvetaking i produksjonsanlegg	15
3.2.1 Prøvetakingspunkter produsent 1	15
3.2.2 Prøvetakningspunkter produsent 2	17
3.3 Bearbeiding av prøvene	20
3.3.1 Næringsmedier og atmosfære	20
3.4 Produkter	21
3.5 Lagringsforsøk kjøttpålegg	22

3.5.1	Lagringsforsøk 1	23
3.5.2	Lagringsforsøk 2	24
3.6	Sensorisk benkeforsøk	27
3.6.1	Sensorisk bedømmelse av pålegg fra lagringsforsøk 1	28
3.6.2	Sensorisk bedømmelse av pålegg fra lagringsforsøk 2	30
3.7	Statistiske analyser	31
3.7.1	Statistisk analyse av data fra produsenter	31
3.7.2	Statistisk analyse av data fra lagringsforsøk	31
3.7.3	Statistisk analyse av sensoriske data	31
3.7.4	Statistisk analyse av dominerende slekter i åpnet og uåpnet produkt	31
3.8	Identifisering av kolonier	32
3.8.1	Valg av kolonier til identifisering	33
3.8.2	Lagringsforsøk 1	34
3.8.3	Lagringsforsøk 2	34
3.8.4	Lysering av bakterier	35
3.8.5	Polymerase chain reaction (PCR)	35
3.8.6	Gelelektroforese	38
3.9	16S-rDNA sekvensering	38
3.9.1	Sekvensredigering	39
3.10	Dyrkingsuavhengig analyse (Miseq)	39
3.11	DNA fingerprinting av isolater	42
3.11.1	Isolering av DNA	42
3.11.2	Random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR)	43
3.11.3	Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR)	43
4	Resultater	45
4.1	Prøvetakning av overflater hos kjøttbedrifter	45
4.2	Lagringsforsøk 1	49

4.2.1	Bakterienivå i kjøttpålegg	49
4.2.2	Sensorisk bedømmelse av lagret kjøttpålegg	52
	Lagringsforsøk 2	55
4.2.3	Bakterienivå i kjøttpålegg	55
4.2.4	Sensorisk bedømmelse av lagret kjøttpålegg	58
4.3	Identifisering av bakterier.....	60
4.3.1	Identifisering av bakterier fra produksjonsmiljø.....	60
4.3.2	Identifisering av bakterier i kjøttpålegg	62
4.4	DNA fingerprinting av isolater.....	70
5	Diskusjon.....	74
5.1	Bakterienivå hos produsenter og på produkter	74
5.1.1	Bakterienivåer hos produsent 1 og 2	74
5.1.2	Bakterienivå i kjøttpålegg	75
5.2	Påviste bakterier hos produsenter og i kjøttpålegg.....	77
5.2.1	Påviste bakterier hos produsent 1, pepperskinke og røkt skinke.....	77
5.2.2	Påviste bakterier hos produsent 2, kyllingpålegg, kokt skinke og servelat.....	78
5.3	Sensorisk bedømmelse	82
5.4	Genotyping	84
6	Konklusjon	86
7	Forslag til videre arbeid.....	87
8	Referanser.....	88
9	Vedlegg	91

1 Innledning

Uønsket vekst av bakterier er en stor utfordring for holdbarheten på mange kjølelagrede, spiseklare produkter, som for eksempel skivet kjøttpålegg. For kjøttindustrien er det av stor økonomisk interesse å forlenge holdbarheten til slike produkter. Et viktig aspekt ved dette er å redusere matsvinn, både fra et økonomisk, økologisk og miljømessig perspektiv. I en rapport utført av Østfoldforskning i 2013, ble det kartlagt at i gjennomsnitt blir det kastet 51 kg. mat i året per innbygger i Norge. Produktgruppen ferdig mat (blant annet varmebehandlet kjøttpålegg), fersk fisk og ferskt kjøtt utgjør 7% av årlig matsvinn (Hanssen & Schakenda 2011).

For å oppnå mindre matsvinn som skyldes forringelse, er det nødvendig med økt forståelse om bakteriene som er tilstede i produktene og hvordan forringelse utvikles under ulike lagringsforhold. I løpet av produksjonsprosessen er det mange potensielle smittekilder som kan påvirke bakteriefloraen i produktet. Det er lite kunnskap om hvilke bakterier som påvirker forringelse mest, og hvor de overføres fra. Det er antatt at bakteriene kommer fra råvaren, produksjonsmiljøet eller overført fra utstyr. I hvilken grad disse faktorene påvirker holdbarheten til produktene vil kunne variere mellom produksjonsanlegg og type produkter. I tillegg til type bakterier og egenskapene til disse, vil forhold under lagring ha stor betydning for produktkvalitet og holdbarhet.

Varmebehandling av kjøttpålegg dreper de fleste bakteriene tilstede, men enkelte sporedannende bakterier som *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, og flere arter i slekten *Bacillus* kan overleve varmebehandlingen, og bidra til forringelse slik at holdbarheten blir redusert (Høyem 1996a). Smitte av pålegget etter varmebehandling er trolig årsak til bakterier i denne typen produkter. Manuell håndtering, kontakt med utstyr samt skiving og pakking av pålegget kan bidra til overføring av bakterier etter varmebehandling (Høyem 1996b; Vasilopoulos *et al.* 2010).

I denne oppgaven ble bakteriefloraen i deler av produksjonsprosessen hos to produsenter og i utvalgte påleggsprodukter analysert. Målet med dette var å studere sammenhengen mellom bakterier i produksjonsanlegg og bakterier i kjøttpålegg, samt å kartlegge forringere i produktene. Det er ønskelig å lokalisere forringerne i produksjonslokalet, slik at de kan bli fjernet og dermed unngå at de blir overført til produktene.

Produktene ble lagret ved ulike temperaturer, både åpnet og uåpent, i to ulike lagringsforsøk. I lagringsforsøk 1 ble produktene lagret uåpent ved 4°C til utløpsdato og en uke over utløpsdato. I lagringsforsøk 2 ble utvalgte påleggsprodukter lagret under betingelser som tilsvarer forbrukerens håndtering av produktet. Påleggspakken ble lagret åpnet og uåpent ved ulike kjøletemperaturer (4°C og 8°C), og ved 25°C i to timer daglig, for å tilsvare realistisk håndtering av pålegg, hvor produktet lagres kjølig, men også ligger vekselvis i romtemperatur under måltider.

Mikrobiologiske analyser ble utført på kjøttpålegg ved ulike lagringstider, og bakteriefloraen ble identifisert ved dyrkingsavhengig og dyrkingsuavhengig analyse. Genotyping ble utført på kolonier av samme slekt fra ulike påleggstyper, og fra prøvepunkter i produksjonsanlegg. Produktene ble også vurdert sensorisk for å kartlegge sammenhengen mellom forringere og endring i sensoriske egenskaper.

2 Teori

2.1 Spiseklare kjøttprodukter

Spiseklare kjøttprodukter utgjør en stor andel av totalt matvareinnkjøp i Europa (Ovca & Jevšnik 2009). Dette innebærer at produksjon av spiseklare kjøttprodukter foregår i storskala og blir konsumert av mange personer. Kvalitetssikring av slike produkter er derfor svært viktig. Betingelser for spiseklare produkter er beskrevet i det norske lovverket, forskrift (EF) nr. 2073/2005 om mikrobiologiske kriterier for næringsmidler, artikkel 2. Begrepet ”spiseferdige næringsmidler” er beskrevet på følgende måte: ”næringsmidler som produsenten eller fabrikanten har framstilt med henblikk på direkte konsum uten at koking eller annen tilberedning er nødvendig for å fjerne, eller redusere til et akseptabelt nivå, uønskede mikroorganismer” (Lovdata).

Kvalitet og god produksjonshygiene er nødvendig for å sikre konsumentene trygg mat med optimal holdbarhet, slik at kontaminering og spredning av matbårne patogene mikroorganismer blir forhindret. Smitte av mikroorganismer kan forringe produktet, slik at holdbarhet og kvalitet blir nedsatt. Holdbarhet blir påvirket av blant annet hygiene under produksjon og i produksjonslokalet generelt, grad av manuell håndtering, lagringstemperatur og pakkemetode (Borch *et al.* 1996; Høyem 1996c).

En viktig faktor for å begrense vekst av uønskede mikroorganismer, er ved å opprettholde en ubrutt kjølekjede fra produksjon til konsum av spiseklare kjøttprodukter. Dette innebærer at slaktet blir raskt kjølt ned, og forblir oppbevart ved lav temperatur ved videre lagring av både produsenten, i løpet av prosessering, pakking og distribusjon, i butikk, og av forbrukeren når produktet blir oppbevart i husholdningen.

2.2 Forringelse av varmebehandlet kjøttpålegg

Forringet produkt kjennetegnes ved uønsket lukt, farge og smak. Slim-, og gassproduksjon og synlig vekst av mikroorganismer kan også forekomme (Borch *et al.* 1996).

Sammensetning av forringelsesflora avhenger av mange ulike faktorer, blant annet type råvare, produksjonsprosessen, bruk av konserveringsmidler, lagringstemperatur, grad av varmebehandling, pakkemetode og tilgang på oksygen. Bakteriefloren i varmebehandlet kjøttpålegg vil variere ved aerob og anaerob lagring, og ved pakking i modifisert atmosfære (MA).

Mikroorganismer er hovedansvarlig for forringelse av næringsmidler, og 25% av all mat blir kastet etter høsting og slakting på verdensbasis grunnet mikrobiell forringelse (Gram *et al.* 2002). Forringelse av produkter er ikke den eneste årsaken til matsvinn. På verdensbasis er det antatt at omtrent halvparten av all mat som blir produsert blir kastet, som inkluderer at store mengder nyttbar mat går tapt (Lundqvist *et al.* 2008). I Norge er det forbrukere som står for omtrent 80% av totalt matsvinn. Næringsmiddelprodusenter, grossister og dagligvarebutikker er ansvarlig for resterende 20% av årlig matsvinn (Hanssen & Schakenda 2011; Hanssen & Møller 2013).

Østfoldforskning utførte en forbrukerundersøkelse om årsaker til kasting av mat i 2013. Av de 1000 forbrukerne som deltok i undersøkelsen, oppga 55 % at utløpsdato var den avgjørende årsaken til at kjøttpålegg i husstanden blir kastet (Hanssen & Møller 2013).

Dette tyder på at økt holdbarhetstid kan redusere årlig matsvinn. En forutsetning for dette, er at det ikke går på bekostning av mattrygghet, da *Listeria monocytogens* har evne til å vokse i lukkede påleggspakker lagret ved kjøleskapstemperatur. Økt bevissthet om matsvinn blant forbrukere og evne til å kontrollsjekke produktet kan bidra til å redusere matsvinn.

2.2.1 Kjøttets egenskaper

Kjøtt inneholder næringsstoffer og vann som bakterier trenger for å utføre metabolisme. Metabolitter og endeprodukter kan endre kvaliteten i spiseklare kjøttprodukter ved å bidra til forringelse. Kjemiske og fysiske egenskaper, vannaktivitet og pH i kjøttet er faktorer som påvirker vekst av mikroorganismer i varmehandlet kjøttpålegg (Borch *et al.* 1996).

I varmebehandlet kjøttprodukter er pH-verdien mellom 6,0 og 6,5. I løpet av lagring kan pH-verdien synke, fra 5,0 til 5,3, som en konsekvens av metabolismen melkesyrebakterier utfører (Borch *et al.* 1996). Bakterier trenger ikke vann for overlevelse, men for reproduksjon og vekst, og benytter seg av vann i fri tilstand (Høyem 1996c). Tilsetningsstoffer som inneholder salter kan redusere mengde fritt vann i et produkt, og dermed hindre vekst av mikroorganismer som er sensitive for salt, som *Pseudomonas* spp. og *Enterobacteriaceae*. Melkesyrebakterier og *Micrococcus* tåler høyere nivå av salt og vil dominere ved disse betingelsene (Borch *et al.* 1996; Egan 1983).

2.2.2 Interaksjoner mellom bakterier i kjøttpålegg

Interaksjoner mellom bakterier tilstede på produktet påvirker utviklingen av bakterieflora.

Det er antatt at mikrobiell forringelse av næringsmidler er nådd da bakterienivået i produktet er mellom 10^7 og 10^9 CFU/g (Gram *et al.* 2002).

Antagonisme, metabiose og quorum sensing er noen mikrobielle mekanismer som påvirker seleksjon i bakterieflora på næringsmidler. Antagonisme er konkurranse mellom bakteriearter om de samme næringsstoffene. En av bakterieartene produserer forbindelser, som bakteriosiner og andre toksiner, som hemmer vekst av den andre arten, slik at den blir utkonkurrert. Et eksempel på dette er Gram-negative bakterier som produserer NH_3 og trimetyl-aminer, som er giftig for en rekke bakterier (Gram *et al.* 2002).

Metabiose er en annen interaksjon som påvirker bakteriefloraen i kjøttprodukter. En bakterieart er avhengig av et/ flere produkter som en annen bakterieart produserer, slik at miljøet blir favoriserbart. Eksempler på dette er Gram-negativ bakterieflora som fjerner oksygen, slik at anaerobe organismer får mulighet til å vokse på produktet. I andre tilfeller kan en organisme skaffe næringsstoffer som fremmer vekst av en annen (Gram *et al.* 2002).

Quorum sensing er kommunikasjon med kjemiske signaler mellom bakterier. Denne typen kommunikasjon fører til at bakteriene i en populasjon kan koordinere genuttrykk av fenotypiske egenskaper, som f. eks hydrolytiske enzymer. Uttrykk av egenskapene er kontrollert av blant annet genregulering, størrelse på bakteriepopulasjonen og næringsstoffer. Syntetiserte peptider fungerer som kjemiske kommunikasjonssignaler, som fester seg i reseptorer i cellemembranen på andre bakterier i nærheten. Dette fører til at transkripsjon av spesifikke gener blir utført. Det er uvisst hvordan quorum sensing påvirker forringelse, men kommunikasjonspeptider (AHL) er påvist i vakuumpakket kylling- og kjøttpålegg og andre typer næringsmidler (Gram *et al.* 2002).

2.2.3 Forringere på kjøttpålegg

Hvert enkelt næringsmiddel inneholder en spesifikk bakterieflora til enhver tid, som blir påvirket av produksjonshygiene, konserveringsmidler, produktegenskaper (f.eks pH og vannaktivitet) og lagringsforhold (Gram *et al.* 2002). Bakterieflora kan påvirke produktet negativt slik at det ikke lenger er egnet for konsumering. Det er stor variasjon i forringelsespotensialet mellom bakterier innenfor en slekt eller en art. Det er ikke

nødvendigvis de bakterieartene som er i flertall som sørger for forringelse, men arter som utgjør en liten andel av total bakterieflora. Dette gjør det vanskelig å detektere slike forringere, da de ikke nødvendigvis manifesterer seg i typiske forringelsesreaksjoner (Nychas *et al.* 2008).

Forringere som ofte blir påvist på kjøtt og fjørfe er listet opp i Tabell 2.1, samt Gram-reaksjon og tilstedeværelse i rått og behandlet kjøtt.

Tabell 2.1 Bakterielle forringere funnet i rått og behandlet kjøtt (Nychas *et al.* 2008).

Bakterieslekt	Gram-reaksjon	Tilstede i rått	Tilstede i behandlet kjøtt
<i>Achromobacter</i>	–	X ^a	
<i>Acinetobacter</i>	–	XX ^b	X
<i>Aeromonas</i>	–	XX	X
<i>Alcaligenes</i>	–	X	
<i>Alteromonas</i>	–	X	X
<i>Arthrobacter</i>	±	X	X
<i>Bacillus</i>	+	X	X
<i>Brochothrix</i>	+	X	X
<i>Campylobacter</i>	–	X	
<i>Carnobacterium</i>	+	X	
<i>Chromobacterium</i>	–	X	
<i>Citrobacter</i>	–	X	
<i>Clostridium</i>	+	X	
<i>Corynebacterium</i>	+	X	X
<i>Enterobacter</i>	–	X	X
<i>Enterococcus</i>	+	XX	X
<i>Escherichia</i>	–	X	
<i>Flavobacterium</i>	–	X	
<i>Hafnia</i>	–	X	X
<i>Janthinobacterium</i>	–		X
<i>Klebsiella</i>	–	X	
<i>Kluyvera</i>	–	X	
<i>Kocuria</i>	+	X	X
<i>Kurthia</i>	+	X	
<i>Lactobacillus</i>	+	X	XX
<i>Lactococcus</i>	+	X	
<i>Leuconostoc</i>	+	X	X
<i>Listeria</i>	+	X	X

<i>Microbacterium</i>	+	X	X
<i>Micrococcus</i>	+	X	X
<i>Moraxella</i>	–	XX	
<i>Paenibacillus</i>	+	X	X
<i>Pantoea</i>	–	X	
<i>Proteus</i>	–	X	
<i>Providencia</i>	–	X	X
<i>Pseudomonas</i>	–	XX	X
<i>Shewanella</i>	–	X	X
<i>Staphylococcus</i>	+	X	X
<i>Streptococcus</i>	+	X	X
<i>Vibrio</i>	–	X	
<i>Weissella</i>	+	X	X
<i>Yersinia</i>	–	X	

^a forekommer, ^b ofte isolert

Melkesyrebakterier er vanligvis den største gruppen i bakteriefloraen på varmebehandlet kjøttpålegg, og disse forringer kjøttet ved fermentering (Egan 1983). Melkesyrebakterier misfarger kjøttet, senker pH-verdien, slik at produktet får sur smak og lukt. Den lave pH-verdien gjør miljøet surt og kan forhindre at patogene mikroorganismer trives.

Melkesyrebakterier har evne til å vokse under mange ulike betingelser, og kan utkonkurrere *Pseudomonas* spp. og andre Gram-negative aerobe bakterier. Melkesyrebakterier har evne til å vokse ved anaerobe forhold, som i varmebehandlet kjøttpålegg som er pakket i film med lav gasspermeabilitet, og ved aerobe betingelser. Vekst kan i større eller mindre grad hemmes ved høye saltkonsentrasjoner, tilstedeværelse av nitritt, karbon dioksid eller røyk. De har evne til å håndtere lavere pH-verdier enn det Gram-negative bakterier kan.

Andre forringere kan bidra til slim-, og gassproduksjon (Tabell 2.2). *Leuconostoc* kan produsere slim hvis sukrose er tilstede i produktet, og *Lactobacillus viridescens* kan produsere hydrogenperoksid, som er et antimikrobielt stoff. Det finnes også forringere som produserer enzymer som bryter ned komponentene i kjøttet (Borch *et al.* 1996). I en studie utført av Egan ble det påvist at *Brochothrix* forringer vakuumpakket kjøttprodukter raskere enn *Lactobacillus*, når de er tilstede i ekvivalente mengder. Forringelse vil først skje noen uker etter at bakteriepopulasjonen har nådd likevekt (Egan 1983).

Tabell 2.2 Forringelsesreaksjoner på kjøttprodukter utført av ulike bakterier (Nychas *et al.* 2008).

Utfall	Produkt	Bakterie
Slimproduksjon	Kjøtt	<i>Pseudomonas</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Weissella</i> , <i>Brochothrix</i>
H ₂ O ₂ grønnfarge	Kjøtt	<i>Weissella</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>
H ₂ S grønnfarge	Vakuumpakket kjøtt	<i>Shewanella</i>
Sulfid-lukt	Vakuumpakket kjøtt	<i>Clostridium</i> , <i>Hafnia</i>
Forråtnelse	Kokt skinke	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Enterococcus</i>
Fermentering	Kokt skinke	Melkesyrebakterier, <i>Enterococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i>

2.2.4 Bakterief flora blir påvirket av pakkemetode

Pakkemetode er avgjørende for hvilke vekstvilkår som er tilgjengelig i et produkt. I Tabell 2.3 er det listet opp forringere som ofte er funnet på kjøttpålegg ved ulike pakkemetoder. Gram-negative bakterier som *Pseudomonas* spp, dominerer ved aerobe forhold, mens melkesyrebakterier og *Brochothrix* dominerer ved lave nivå av oksygen (Cayre *et al.* 2005; Doulgeraki *et al.* 2010; Pennacchia *et al.* 2011).

Tabell 2.3 Forringere ofte funnet i kjøttprodukter ved ulike pakkemetoder (Nychas *et al.* 2008).

Forringere ofte påvist ved ulike pakkemetoder	
Pakkemetode	Vanlige forringere
Aerobt	<i>Pseudomonas</i> ssp.
Vakuum	<i>Pseudomonas</i> ssp., <i>Brochothrix thermosphacta</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i>
MAP; 100% CO ²	Melkesyrebakterier
MAP; >50% CO ² med O ²	<i>Brochothrix thermosphacta</i>
MAP; 50% CO ²	<i>Enterobacteriaceae</i> , melkesyrebakterier
MAP; <50% CO ² med O ²	<i>B. thermosphacta</i>

En rekke studier er utført med formål å optimalisere pakkemetode for å begrense bakterievekst i spiseklare produkter lagret over tid (Ingham *et al.* 2005; Murcia *et al.* 2003; Quintavalla & Vicini 2002). Ved å begrense resursene bakteriene trenger for overlevelse, vil formering og vekst bli redusert og holdbarhet i produktet øker (Aymerich *et al.* 2008).

Det finnes 3 ulike pakkemetoder som brukes på kjøtt; vakuum-pakking, pakking i modifisert atmosfære (MA) og i luft. I kjøttindustrien er det vanlig å pakke kjøtt i vakuum eller i MA.

Valg av pakkemetode avhenger av blant annet type kjøtt, og grad av varmebehandling kjøttet har vært igjennom. MA består av en kombinasjon av lite eller ingen oksygen, CO₂ og inert nitrogen. Mengden av gassene kan variere mellom produsenter og produkter. Av de nevnte pakkemetodene, gir MA med 100% CO₂ lengst holdbarhet, da CO₂ er generelt lite gunstig for bakterievekst. MA med lite/ intet oksygen hindrer særlig vekst av Gram-negative matbårne bakterier (Borch *et al.* 1996; Nychas *et al.* 2008).

2.2.5 Patogene matbårne bakterier

Patogene, matbårne bakterier kan føre til langvarige negative effekter ved konsum for forbrukeren. Alvorlige tilfeller av matforgiftning kan føre til utvikling av kroniske sykdommer og i verste fall død. *L. monocytogens*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* og *E.coli* er noen matbårne potensielt patogene mikroorganismer som er funnet i spiseklart kjøttpålegg. (Akhtar *et al.* 2009; Hellstrom *et al.* 2010; Hoelzer *et al.* 2011).

L. monocytogens er en matbåren patogen bakterie som kan overføres til mennesker via konsumering av blant annet ulike typer kjøtt, fjørfe, sjømat og mykost (Hellstrom *et al.* 2010; Mengesha *et al.* 2009). En mengde på >1000 CFU /g⁻¹ *L. monocytogens* tilstede i produktet kan gi sykdom ved konsum (Thevenot *et al.* 2006). *L. monocytogens* er isolert fra blant annet gårdsbruk, slakteri produksjonsanlegg, prosessert mat, jord, vegetasjon og kloakk (Ivanek *et al.* 2006; Mengesha *et al.* 2009). *L. monocytogens* har evne til formere seg ved temperaturer mellom 0 og 45° C. Blant annet kjølelagret kjøttpålegg med lang holdbarhetsdato som ikke krever varmebehandling er utsatt for vekst (Membre *et al.* 2004; Thevenot *et al.* 2006). Kjøttindustrien hindrer vekst av *L. monocytogens* ved å tilsette laktat i spiseklare kjøttprodukter (Stasiewicz *et al.* 2011). Bakterien kan føre til listeriose, som inkludere ensefalitt (hjernebetennelse), meningitt (hjernehinnebetennelse), spontanabort og død. Eldre, gravide, små barn og personer med nedsatt immunforsvar er særlig utsatt (Di Pinto *et al.* 2010).

Bakterieslekten *Salmonella* kan føre til matforgiftning med symptomene diarè, hodepine, kvalme og dehydrering. Alvorlige sykdommer som reaktiv artritt og bakteriemi forekommer i sjeldent. Infeksjoner som skyldes *Salmonella* kalles salmonellose (Kaistha *et al.* 2011). Kjøtt er den vanligste smitekilden av *Salmonella*, men kan i sjeldne tilfeller smitte mellom mennekser og dyr (Hoelzer *et al.* 2011). *Salmonella* er funnet i svinekjøtt, fjørfe,

meieriprodukter, kloakk, vann, jord, grønnsaker og i mage, -tarmsystemet hos mennesker og dyr (Baudart *et al.* 2000; van Overbeek *et al.* 2014).

Bakterieartene *C. perfringens* og *C. botulinum* forekommer i kjøtt av fjørfe (Brul *et al.* 2011). *C. perfringens* er en anaerob, sporedannende organisme som overlever koking. Bakterien kan føre til to ulike sykdommer i mennesker, hvor type A er matbåren. Infeksjon medfører kortvarig diarè og er antatt å være den tredje mest vanlige årsaken til matforgiftning (Akhtar *et al.* 2009).

C. botulinum er en anaerob sporedannende organisme som forårsaker botulisme, en sjelden, men alvorlig matbåren sykdom. Bakterien produserer et neurotoksin som paralyserer nervesystemet. Bakterien er isolert fra jord, avfall fra slaktehus, gjødsel og i mage og tarm hos mennesker og dyr (Kruger *et al.* 2014).

2.3 Produksjon av kjøttpålegg – fra slakt til pålegg

Faktorer som påvirker holdbarhet av varmebehandlet kjøttpålegg under produksjon er beskrevet i dette kapitlet.

Slakteprosessen kan ha påvirkning på produktets kvalitet og holdbarhet. Det er nødvendig at hygienetiltak blir opprettholdt gjennom hele produksjonsprosessen, fra slakt til bearbeiding av råvare, til slicing og pakking. Dette er tilfellet for både prosessert råvare og for videreforedte produkter som kjøttpålegg.

Prosedyrene som blir utført fra slakt til videre prosessering av kjøttstykkene, foregår i en rekkefølge for å bevare kvalitet i kjøttet og for å hindre smitte av uønskede mikroorganismer. Spiseklart kjøttpålegg blir varmebehandlet mellom 60 til 85° C i 6 til 8 timer. Denne behandlingen bevarer smak og struktur i kjøttet, gjør det mørt og samtidig eliminerer vegetative celler i produktet. Bakteriesporer som *C. botulinum* og *C. perfringens* har evne til å overleve varmebehandlingen og vekst blir forhindret ved å tilsette salt og nitritt i produktet (Akhtar *et al.* 2009; Lund *et al.* 2000).

2.3.1 Tilsetningsstoffer

Tilsetningsstoffer er en samlebetegnelse på stoffer som blir tilsatt i små mengder i produktene under produksjon. Hensikten med disse stoffene er å gi forlenget holdbarhet eller forbedre produktets utseende og smak. Tilsetningsstoffene er nummerert og delt inn i grupper på grunnlag av funksjon (Tabell 2.4). Gruppene består av blant annet konserveringsmidler, antioksidanter, fargestoffer, aromaforsterkere, søtstoffer, og gasser brukt i lukkede emballasjer. Konserveringsmidler og antioksidanter gir økt holdbarhet på maten ved å hindre vekst av mikroorganismer og ved å forhindre oksidering (harskning av fett og misfaging) av produktet. Fargestoffer blir tilsatt for at produktet skal få ønsket farge. Andre tilsetningsstoffer forsterker aroma og smak i produktet, eller påvirker konsistens og struktur (Mattilsynet 2004).

Tabell 2.4 Gruppering og inndeling av tilsetningsstoffene på grunnlag av funksjon (Mattilsynet 2011a).

Funksjon	E-nummer
Fargestoffer	E100-E199
Konserveringsmidler	E200-E299
Antioksidanter	E300-E399
Konsistensmidler	E400-E499
Resterende grupper (antiklumpmidler, gasser brukt i emballasje, søtstoffer, uklassifiserte stoffer osv)	E500-E1599

Tilsetningsstoffer brukt i næringsmidler i EU/EØS er godkjent av EU-kommisjonen etter anbefalinger av europeiske myndighet for næringsmiddeltrygghet (EFSA). Krav til godkjenning inkluderer at stoffet er nødvendig av tekniske årsaker og at stoffet i seg selv eller bruken av det ikke vil gi helseskader. Godkjente tilsetningsstoffer er merket med individuelle E-nummer. Produsenten skal gjøre forbrukeren oppmerksom på tilsetningsstoffer som er benyttet i produktet ved å merke emballasjen (Mattilsynet 2011a). I Tabell 2.5 er det listet opp tilsetningsstoffer med navn og E-nummer, samt egenskap og funksjon for stoffer som er mye brukt i varmebehandlet kjøttpålegg.

Tabell 2.5 Tilsetningsstoffer ofte benyttet i varmebehandlet kjøttpålegg.

Tilsetningsstoff¹	E-nummer¹	Egenskap²	Funksjon¹
Fosfater	E338, E339, E340, E341, E343, E450, E451, E452	Stabilisator	Stabiliserer surhetsgraden i kjøttet og binder vann.
Kaliumlaktat	E326	Antioksidant, surhetregulerende middel (salt av melkesyre)	Forhindrer harskning.
Natriumnitritt/ nitritt	E250	Konserveringsmiddel	Hindrer vekst av <i>Listeria</i> , <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> og <i>Clostridium botulinum</i> . Har fargestabiliserende effekt; binder til myoglobin i kjøttet og bevarer farge.
Natriumaskorbat	E301	Antioksidant, surhetregulerende middel	Forhindrer harsking og øker produktets holdbarhet. Vedlikeholder rødfargen i kjøttet.
Kaliumacetat	E261	Konserveringsmiddel, surhetregulerende middel	Kontrollerer pH i kjøttet, og er konserverende ³ .
Erytorbinsyre(Iso-askorbinsyre)	E315	Antioksidant, surhetregulerende middel	Forhindrer harsking og øker produktets holdbarhet. Vedlikeholder rødfargen i kjøttet.
Natriumerytrobat	E316	Antioksidant, surhetregulerende middel	Forhindrer harsking og øker produktets holdbarhet. Vedlikeholder rødfargen i kjøttet.
Difosfater	E450, E451	stabilisator	Gir konsistens ved å binde vann i kjøttet.
Karragenan	E407	Stabilisator, fortykningsmiddel	Gir konsistens ved å binde vann i kjøttet

¹(Gilde u.å.-a)

²(Mattilsynet 2011b)

³(Saltmarsh 2013)

2.3.2 Bakterier i produksjonsanlegg

Fra slakt til ferdig produkt er det potensielt mange smitteveier som kan tilføre bakterier til produksjonsprosessen og videre til produktet. I muskler og vev hos levende dyr er det lite bakterier til stede (Nychas *et al.* 2008). Når dyret blir slaktet, vil bakteriefloraen fra dyrets indre organer bli eksponert. Det er særlig bakterier fra mage- og tarm som er uheldig for kontaminering av kjøttet. Kontaminering kan føre til tidlig forringelse av endelig produkt, som bidrar til økonomisk tap for kjøttindustrien. Bakteriefloraen kan også inneholde patogene organismer som kan gjøre forbrukeren syk (Papadopoulou *et al.* 2012) (se 2.2.5 Patogene matbårne bakterier).

Som nevnt tidligere, blir kjøttpålegg varmebehandlet for å fjerne mikroorganismer tilstede i kjøttet. Til tross for dette, er det muligheter for at produktet allikevel blir kontaminert under senere trinn i produksjonen. Det er utført få studier om opprinnelsen til disse kontaminantene (Chevallier *et al.* 2006; Samelis *et al.* 1998), og de fleste studier angående bakterieflora i matproduksjon handler i hovedsak om patogene matbårne organismer (Byrne *et al.* 2008; Chasseignaux *et al.* 2002). Det er antatt at bakterier funnet på varmebehandlet kjøttpålegg har kommet til etter varmebehandling, i løpet av slicing og pakking, fra produksjonslokalet eller fra personer som behandler produktene (Høyem 1996c; Vasilopoulos *et al.* 2010).

Underliggende årsaker kan være at renholdet som praktiseres ikke eliminerer bakteriene som er tilstede i produksjonsanlegget eller at produksjonsrutinene bidrar til kryssmitte mellom råvarer og produkter, eller mellom produksjonsmiljø og produkter.

2.3.3 Hygienetiltak i produksjonsanlegg

Produsenter av spiseklare kjøttprodukter er pålagt å følge lover og forskrifter for å sørge for generell god hygiene, slik at kontaminering av produkt skjer i minst mulig grad. Dette sørger for at kvalitet og holdbarhet i produktet blir opprettholdt.

Utforming av produksjonslokalet og produksjonslinjer er av stor betydning for å opprettholde god hygiene. Lokalet bør være i en logisk og praktisk rekkefølge, slik at urene og rene soner skal være separert. Produktet blir fraktet fra urene soner og gradvis over i mer rene soner i løpet av prosessering, slikt at kryssing av rene produkt og urene soner må forhindres. Lokalet og alt utstyr må være vaskbart og av glatte overflater, i tillegg til å være enkle å demontere ved vask og flytting. Sprekker, ugunstige oppsamlingspunkter og lekkasjer i vegger, tak, og

på produksjonsutstyr er områder som er vanskelig å holde rene og oppsamling av bakterier kan finne sted på slike steder (Høyem 1996d).

Fastsatte avfallsrutiner må følges, og prosedyrer for måling av temperatur, fuktighet og kontroll av lysforhold og ventilasjon bør følges opp. Opplæring om hygiene og arbeidsmetoder som hindrer kontaminering, rent arbeidstøy og engangsutstyr skal være tilgjengelig for ansatte (Høyem 1996b).

Renhold av produksjonslinjen skal utføres daglig, med tilpasset rengjøringsmidler. Ved slicing og pakking av ulike produkttyper ved samme produksjonslinje, er det nødvendig med hyppigere renhold enn en gang per dag. Dette er for å hindre krysskontaminering fra en produkttype til en annen. Dårlig renhold kan føre til at forringere og matbårne patogene organismer kontaminerer produktet, og reduserer kvalitet og holdbarhet. Ved utilstrekkelig renhold kan noen stammer *Listeria* ha tilpasset seg, slik at de overlever renhold og desinfeksjonsmidler i produksjonsanlegg. De kan vokse ved lave temperaturer og på mange typer overflater. Det er kjent at de kan danne "husstammer" som etablerer seg i produksjonsmiljøet og blir værende over lengre tid. Disse er vanskelig å få fjernet. Både *L. monocytogens* og *Pseudomonas* kan danne biofilm, som er vanskelig å bli kvitt ved vanlig vasking. Fjerning av biofilm blir derfor utført ved mekanisk vasking (Fatemi & Frank 1999; Thevenot *et al.* 2006).

2.4 Forbrukeransvar

Forbrukeren har et ansvar for oppfølging av produktene etter innkjøp. Dette inkluderer opprettholdelse av kjølekjeden, god hygiene i kjøleskapet og ellers på kjøkkenet hvor maten blir tidvis oppbevart, og god håndhygiene ved håndtering av produktet. Mattilsynet anbefaler at temperaturen i kjøleskapet bør være mellom 2-4°C, da mange mikroorganismer vokser sakte ved disse temperaturene (Mattilsynet 2008). Utløpsdato på produktet viser til siste anbefalte dato for konsumering, dersom pakken ikke har blitt åpnet. Etter åpning er produktet å anse som ferskvare, og har en holdbarhet på 3-5 dager. Holdbarheten på åpnet produkt er avhengig av hygieneforhold og temperatur i kjøleskapet, periodevis oppbevaring i romtemperatur (under måltider), oksygentilgang, lysforhold og håndhygiene ved håndtering av produktet. Riktig håndtering bidrar til å redusere vekst av uønskede mikroorganismer (Gilde u.å.-b). Håndtering som ikke er hensiktsmessig vil variere mellom produkter, da noen påleggstyper er mer robuste og tåler høyere grad av ugunstig håndtering enn andre. Det er lite kunnskap om årsaker til at dette varierer.

3 Materialer og metoder

3.1 Produsenter og produkter

Fem typer skivet, varmebehandlet kjøttpålegg (pepperskinke, røkt skinke, kyllingpålegg, kokt skinke og servelat) fra to produsenter (produsent 1 og 2), ble analysert mikrobiologisk og sensorisk i denne oppgaven. Pepperskinke og røkt skinke ble produsert av produsent 1, og kyllingpålegg, kokt skinke og servelat ble produsert av produsent 2. Det ble utført mikrobiologiske analyser av produktene ved ulike lagringstider og betingelser. Det ble også tatt prøver av hel pepperskinke. Det ble kjøpt påleggsprodukter fra butikk og direkte fra produsentene, med unntak av servelat som kun ble kjøpt fra butikk. Pålegg kjøpt direkte fra produsent ble produsert samme dag som prøvetaking i produksjonsanlegg ble utført.

3.2 Prøvetaking i produksjonsanlegg






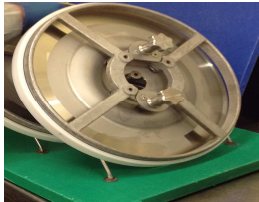



Under bedriftbesøk ble det tatt prøver av overflater i produksjonsanlegg hos produsent 1 og 2. Prøvetakning ble utført ved produksjonslinjene hvor påleggsproduktene analysert i denne oppgaven ble slicet og pakket. Overflater i direkte kontakt med produktet og andre flater i forbindelse med produksjonslinjene ble prøvetatt etter renhold (før oppstart av slicing og pakking), og under slicing og pakking av produktene. Det ble ikke tatt prøver av produksjonslinjen hvor servelat ble slicet og pakket, grunnet tidsbegrensninger under bedriftbesøket.




Prøvetaking ble utført med engangshansker og steril, fuktig klut. Etter at kluten ble dratt hard over overflaten, ble den plassert tilbake i posen, som ble lukket og merket med navn. Størrelsen på prøvepunktet ble notert. Prøvene ble oppbevart i kjølebag fra prøvetaking til videre bearbeiding samme dag på NOFIMA, Ås. I den grad det var mulig, ble tilsvarende overflater prøvetatt i begge produksjonsanleggene.

3.2.1 Prøvetakingspunkter produsent 1

Produsent 1 er en liten bedrift og har to produksjonslinjer for kjøttpålegg. Slicing og pakking av pepperskinke og røkt skinke ble utført ved den samme produksjonslinjen, og linjen ble desinfisert mellom slicing og pakking av de ulike påleggsproduktene. Tabell 3.1 gir oversikt over prøvetakningspunktene av produksjonslinjen før produksjonsstart og under produksjon av pepperskinke og røkt skinke. Det ble tatt prøver av 12 ulike overflater ved produksjonslinjen i anlegget hos produsent 1, hvor 8 var i direkte kontakt med produktet.

Tabell 3.1 Prøvepunkter tatt av produksjonslinjen før og under slicing av pepperskinke og røkt skinke.





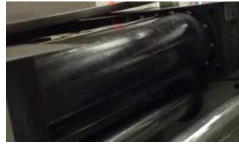




Prøvepunkter tatt etter renhold	Prøvepunkter tatt under slicing av pepperskinke	Prøvepunkter tatt under slicing av røkt skinke	Bilde av prøvepunkt
Sprettekniv	Sprettekniv	Sprettekniv	
Kontrollpanel	Kontrollpanel	Kontrollpanel	
Vekt	Vekt	Vekt	
Sprettebord	Sprettebord	Sprettebord	
Metallvalse	Metallvalse	Metallvalse	
Skjæreblad	Skjæreblad	Skjæreblad	
Påleggsavlaster	Påleggsavlaster	Påleggsavlaster	
Små transportbånd	Små transportbånd	Små transportbånd	
Blå/hvite strikker	Blå/hvite strikker	Blå/hvite strikker	

Transportbånd (hoved)	Transportbånd (hoved)	Transportbånd (hoved)	
Gulv/undersiden av linjen	Gulv/undersiden av linjen	-	
Sluk	Sluk	-	










3.2.2 Prøvetakningspunkter produsent 2

Hos produsent 2 ble kokt skinke, kyllingpålegg og servelat slicet og pakket på individuelle linjer. Prøvetaking ble utført på linjene hvor kyllingpålegg og kokt skinke ble slicet og pakket. Tabell 3.2 og Tabell 3.3 gir en oversikt over prøvetakningspunktene tatt før og under produksjon av henholdsvis kyllingpålegg og kokt skinke. Det ble tatt prøver av 10 ulike punkter ved hver produksjonslinje, og halvparten av punkter var i direkte kontakt med produktet.

Tabell 3.2 Prøvepunkter tatt av produksjonslinjen før og under slicing av kyllingpålegg.

Prøvepunkter tatt etter renhold (kyllingpålegg)	Prøvepunkter tatt under slicing av kyllingpålegg	Bilde av prøvepunkt
Stigebånd	Stigebånd	
Blå strikkbånd	Blå strikkbånd	
Skjæreblad	-	
Blått transportbånd	Blått transportbånd	
Svart valse/lekkasjepunkt	-	
Kontrollpanel Oppsamlingsbord	Kontrollpanel Oppsamlingsbord	
Sluk	Sluk	
-	Gulv/underside av linje	
-	Vekt	

Tabell 3.3 Prøvepunkter tatt av produksjonslinjen før og under slicing av kokt skinke.

Prøvepunkter tatt etter renhold (kokt skinke)	Prøvepunkter tatt under slicing av kokt skinke	Bilde av prøvepunkt
Blå bånd, plastdeler	Blå bånd, plastdeler	
Hvitt transportbånd	Hvitt transportbånd	
Kontrollpanel Sprettebord	Kontrollpanel Sprettebord	
Valser	Valser	
Røde og gule strikker	Røde og gule strikker	
Skumvalse	Skumvalse	
Gulv/undersiden av linjen	Gulv/undersiden av linjen	
Skjæreblad	-	
Lekkasjepunkt valser	Lekkasjepunkt valser	

3.3 Bearbeiding av prøvene

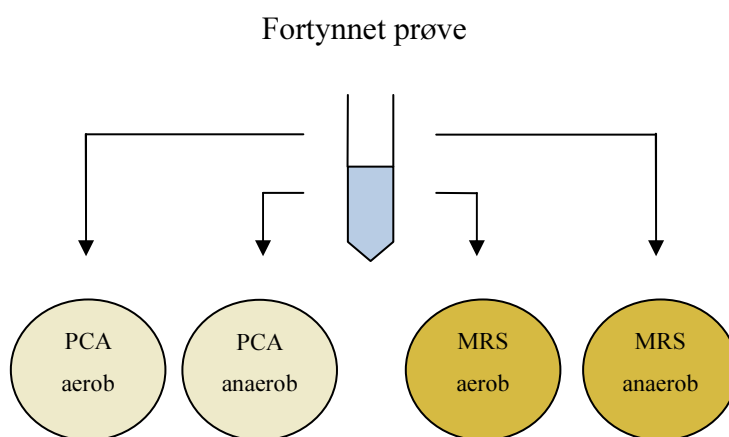
Hver prøve (klut) ble løst i 50 ml peptonvann og deretter plassert i stomacher i ett min. Det ble tatt ut 500 µl av den homogeniserte løsningen, som ble overført til et rør med 4,5 ml peptonvann. Dette var utgangspunktet for en fortynningsrekke. Utvalgte fortynninger ble platet ut for dyrkningsavhengig analyse.

3.3.1 Næringsmedier og atmosfære

Prøvene ble fortynnet med peptonvann og platet ut på de Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS) og Plate Count Agar (PCA). Oppskrift på løsninger og næringsmedier er beskrevet i Vedlegg 1.

Hver fortynning av samtlige prøver ble platet ut på totalt fire skåler, to skåler med hvert næringsmedie (Figur 3.1). Løsningen ble jevnt fordelt over agaren ved bruk av en steril vinkelstav. Skålene ble tørket i avtrekksskap i ca 10 min uten lokk. Etter at prøven hadde tørket, ble en MRS-, og en PCA-skål med samme fortynning stablet i lukket plastpose og inkubert aerobt. De resterende skålene med tilsvarende fortynning og næringsmedier ble inkubert anaerobt. For å danne anaerobe forhold ble skålene plassert i en anaerobkolbe med anaerob-posere (anaerogen, Oxoid).

Skålene ble inkubert ved 15 °C i 5-7 døgn, avhengig av vekst. Etter endt inkuberingstid ble koloniene telt, beskrevet og merket til sekvensering.



Figur 3.1 Utplating av 100 µl fortynnet prøve på to PCA,- og to MRS- skåler. Begge næringsmediene ble inkubert både aerobt og anaerobt.

3.4 Produkter

Påleggsproduktene fra butikk og fra produksjonsanlegg var pakket i modifisert atmosfære (MAP), med unntak av hel pepperskinke som var vakuumpakket. I Tabell 3.4 er det oppført påleggsproduktenes ingredienser, tilsetningsstoffer, næringsinnhold og holdbarhetstid.

Tabell 3.4 Beskrivelse av påleggsproduktene.

Produkt	Ingredienser	Tilsetningsstoffer	Næringsinnhold per 100 g. vare	Holdbarhet (ubrukt emballasje)
Pepper- skinke	Renskåret svinekjøtt (80%), vann, pepper, salt, sukker	Konserveringsmiddel nitritt, stabilisator karragenan og fosfat, antioksidant, kaliumlaktat, druesukker	Energi 427 kJ (102 kcal), protein 18 g., karbohydrater 0,4 g (sukkerarter 0,4g), fett 3 g mettet 1,3g), salt 2,6 g	40 dager fra pakkedato
Hel pepper- skinke	Renskåret svinekjøtt (80%), vann, pepper, salt, sukker	Konserveringsmiddel nitritt stabilisator karragenan og fosfat, antioksidant, kaliumlaktat, druesukker	Energi 427 kJ (102 kcal), protein 18 g, karbohydrater 0,4 g (sukkerarter 0,4g), fett 3 g (mettet 1,3g), salt 2,6 g	60 dager fra pakkedato
Røkt skinke	Røkt, renskåret svinekjøtt (80 %), vann, salt, dekstrose	Konserveringsmiddel natriumnitritt, antioksidant natriumaskorbat og kaliumlaktat, stabilisator fosfat og karragenan	Energi 420 kJ (101 kcal), protein 18 g, karbohydrat 0,4 g (sukkerarter 0,4g), fett 3 g (mettet 1,2g), salt 2,0 g	60 dager fra pakkedato
Kylling- pålegg	Kyllingfilet (83%), vann, salt glukose, krydder, hydrolysert maisprotein, løk	Konserveringsmiddel natriumnitritt (E250), kaliumacetat (E261), kaliumlaktat (E326), antioksidant natriumisoaskorbat (E316), stabilisator difosfater (E450, E451), karragenan (E407)	Energi 411 kJ (97 kcal), protein 20 g, karbohydrat 2 (sukkerarter 0,4 g), fett 1 g (mettede fettsyrer 0,3 g, enumettede fettsyrer 0,4 g, flerumettede fettsyrer 0,2 g), salt 2,0 g	35 dager fra pakkedato
Kokt skinke	Renskåret svinekjøtt av skinke(85%), vann, salt, glukose	Konserveringsmiddel natriumnitritt (E250), kaliumacetat (E261), kaliumlaktat (E326), antioksidant natriumisoaskorbat (E316), stabilisator difosfater (E450, E451), karragenan (E407)	Energi 443 kJ/105 kcal, protein 18 g, karbohydrat 1,1 g (sukkerarter 0,4 g) fett 3,2 g (mettede fettsyrer 1,2 g enumettede fettsyrer 1,5 g, flerumettede fettsyrer 0,5 g) salt 2,3 g	35 dager fra pakkedato
Servelat	Kjøtt av storfe og svin (58%),vann,stivel se, hodekjøtt av svin, salt , løk, krydder, glukose	Konserveringsmiddel natriumnitritt (E250), kaliumacetat (E261), kaliumlaktat (E326), antioksidant natriumisoaskorbat (E316), røykaroma	Energi 998 kJ (240 kcal), protein 12 g, karbohydrat 6,5 g (sukkerarter 0,2 g), fett 18,6 g (mettede fettsyrer 7,3 g, enumettede fettsyrer 8,5 g, flerumettede fettsyrer 2,4 g), salt 1,7g	32 dager fra pakkedato

3.5 Lagringsforsøk kjøttpålegg

To lagringsforsøk ble gjennomført for kjøttpålegg. Tabell 3.5 gir oversikt over påleggstyper brukt i hvert av forsøkene, antall påleggspakker av hver påleggstype og kjøpssted.

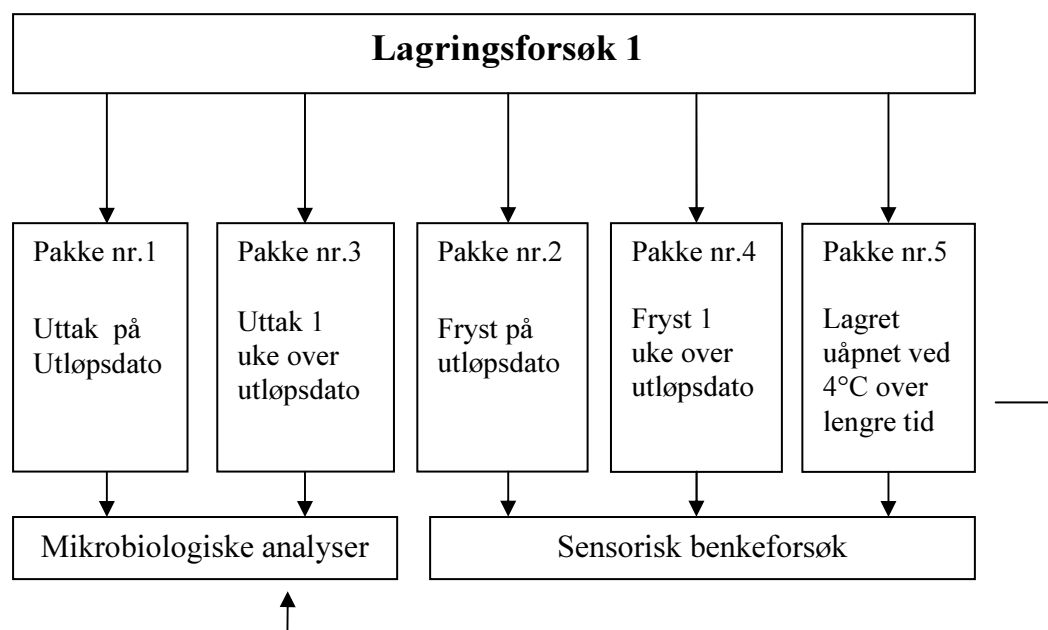
Lagringsforsøk 1 ble benyttet som referanse for å evaluere bakterievekst i lukkede pakninger lagret ved 4°C. I lagringsforsøk 2 ble forholdene endret for å tilsvare en mer realistisk håndtering av produktene, slik at bakterieflora fra både åpne og lukkede påleggspakker ble identifisert.

Tabell 3.5 Antall påleggspakker av hver produkttype som ble lagret i de ulike forsøkene, samt produktenes kjøpssted.

Kjøpssted/lagringsforsøk	Kokt skinke	Pepperskinke	Kyllingpålegg	Servelat	Røkt skinke
Kjøpt i butikk, brukt i lagringsforsøk 1	5 påleggs-pakker	5 påleggs-pakker	5 påleggs-pakker	8 påleggs-pakker (2 batch.nr.)	5 påleggs-pakker
Kjøpt fra produsent, brukt i lagringsforsøk 1		5 påleggs-pakker			5 påleggs-pakker
		2 hele blokker			
Kjøpt i butikk, brukt i lagringsforsøk 2		7 påleggs-pakker			
Kjøpt fra produsent, brukt i lagringsforsøk 2	7 påleggs-pakker		7 påleggs-pakker		

3.5.1 Lagringsforsøk 1

En skjematisk fremstilling av lagringsforhold og uttak av påleggspakkene analysert i lagringsforsøk 1 er vist i Figur 3.2.



Figur 3.2 Grafisk beskrivelse av de nummererte påleggspakkene som ble analysert i lagringsforsøk 1. Oppsettet er tilsvarende for alle produkttypene.

I lagringsforsøk 1 ble 5 pakker av hver påleggstype kjøpt inn, nummerert fra 1 til fem og lagret ved 4°C (Tabell 3.5). Utløpsdato og annen relevant informasjon ble notert. I Tabell 3.6 er det beskrevet oppsettet på de nummererte pakkene for hver påleggstype som ble prøvetatt i lagringsforsøk 1. I tillegg til de 5 påleggspakkene servelat, ble det senere i studien inkludert 3 nye pakker servelat fra et annet batch-nummer. Dette skyldes at en av de nye pakkene inneholdt misfarget servelat, som ble oppdaget i butikk ved en tilfeldighet. Det ble tatt uttak av de 3 nye pakkene på utløpsdato (misfarget produkt) og 1 uke over utløpsdato. Den siste pakken ble fryst på utløpsdato, og evaluert sensorisk, før uttak til mikrobiologiske analyser ble utført.

Uttak til mikrobiologiske analyser ble utført på utløpsdato og 1 uke over utløpsdato. Det ble benyttet en ny påleggspakke ved hvert uttak. Det ble også tatt uttak av en tredje påleggspakke som først ble evaluert i sensorisk benkeforsøk (pakke nr. 5). De fem påleggstypene ble ikke kjøpt inn samtidig og hadde dermed forskjellige utløpsdatoer. Antall dager over utløpsdato ved uttak av den tredje påleggspakken varierte, da sensorisk benkeforsøk ble utført uavhengig av utløpsdato.

Tabell 3.6 Beskrivelse av oppsettet for de nummererte påleggspakkene som ble prøvetatt i lagringsforsøk 1.

Pakkenr.	Oppsett
1	Uttak av 25 g. pålegg til mikrobiologiske analyser på utløpsdato.
2	Fryst uåpnet på utløpsdato. Bedømt i sensorisk benkeforsøk.
3	Uttak av 25 g. pålegg til mikrobiologiske analyser 1 uke over utløpsdato.
4	Fryst uåpnet 1 uke over utløpsdato. Bedømt i sensorisk benkeforsøk.
5	Lagret uåpnet ved 4°C fra innkjøpsdato til sensorisk benkeforsøk. Uttak av 25 g. pålegg til mikrobiologiske analyser etter sensorisk benkeforsøk.

3.5.1.1 Uttak av kjøttpålegg til mikrobiologiske (dyrkningsavhengige) analyser

Uttak av kjøttpålegg til dyrkningsavhengig analyse ble utført ved lagringstidene beskrevet i Tabell 3.6. Uttak ble utført ved at 25 g. pålegg ble skåret ut (på tvers av alle skivene i pakken) med en steril skalpell og overført til en stomacher-pose. Prøven ble fortynnet 10 ganger med peptonvann og homogenisert i ett min. i stomacher. En fortynningsrekke ble dannet med den homogeniserte prøven som utgangspunkt. Fortynninger ble platet ut og inkubert som beskrevet i avsnitt 3.3 og 3.3.1.

Det ble tatt uttak av to hele pepperskinker ved utløpsdato til mikrobiologisk analyse. Det ble skåret ut 25 g. skinke fra to overflater og fra kjernen. Prøven ble fortynnet 10 ganger med peptonvann, platet ut og inkubert som beskrevet i avsnitt 3.3.1. Væsken i emballasjen ble også platet ut på tilsvarende måte.

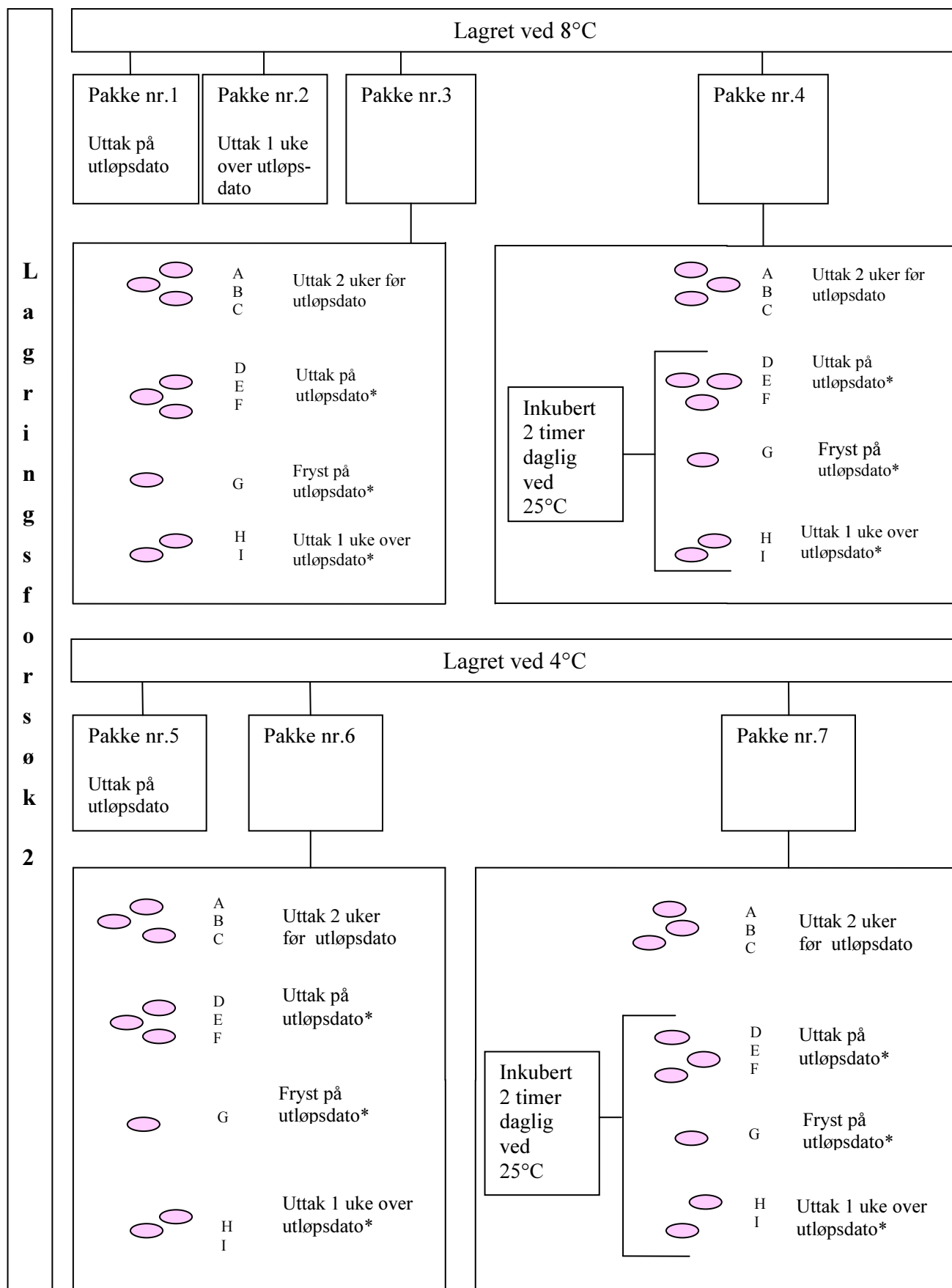
I tillegg ble 12 ml. av den homogeniserte løsningen fra hver prøve fryst, som senere ble benyttet i dyrkningsuavhengig analyse (se avsnitt 3.10).

3.5.1.2 Produkter til sensorisk benkeforsøk

Påleggspakkene nummer 2 og nummer 4 i lagringsforsøk 1 ble fryst uåpnet på henholdsvis utløpsdato og en uke over utløpsdato. Disse pakkene, samt den femte pakken, ble senere bedømt i sensorisk benkeforsøk (se Tabell 3.6 og Figur 3.2).

3.5.2 Lagringsforsøk 2

I lagringsforsøk 2 ble det tatt uttak av både påleggspakker (som i lagringsforsøk 1) og individuelle påleggsskiver. Det ble benyttet flere lagringsbetingelser i lagringsforsøk 2. Grafisk fremstilling over oppsettet i lagringsforsøk 2 er gitt i Figur 3.3.



* Påleggsskivene ble inkubert aerobt etter ”uttak 2 uker før utløpsdato”.

Figur 3.3 Grafik fremstilling av oppsettet i lagringsforsøk 2. Det ble tatt uttak av både hele påleggspakker og av enkeltskiver. Bokstavene i figuren(A til I) refererer til enkeltskivene i påleggspakkene.

Nye påleggspakker av pepperskinke, kyllingpålegg og kokt skinke ble videre studert i lagringsforsøk 2. Syv pakker av hvert pålegg ble benyttet til mikrobiologiske analyser. Etter innkjøp ble pakkene merket fra en til syv og lagret ved 4°C. To uker før utløpsdato ble fire pakker flyttet til 8°C, og de resterende pakkene forble lagret ved 4°C gjennom hele lagringsforsøket. Oppsett for lagringsforhold og uttakstider er beskrevet i Tabell 3.7.

I påleggspakkene 3,4, 6 og 7, ble enkeltskiver i påleggspakken brukt til mikrobiologisk uttak. Skivene ble nummerert alfabetisk. To uker før utløpsdato ble to pakker fra 4°C (pakke nr. 6 og nr. 7) og to pakker fra 8°C (pakke nr. 3 og nr. 4) åpnet. Det ble tatt uttak av de tre øverste skivene (A, B, C) i hver pakke. De resterende skivene ble plassert enkeltvis i petriskåler og plassert i en fuktig plastboks. Skivene fra pakke nr. 3 og nr. 6 ble satt tilbake til respektive lagringstemperaturer fram til neste uttak. Det samme gjelder også for skivene fra pakke nr. 4 og nr. 7, men i tillegg ble de inkubert ved 25°C to timer daglig (hverdager). Neste uttak ble utført på utløpsdato av tre nye skiver (D, E og F) for samtlige påleggspakker. Det siste uttaket ble utført 1 uke over utløpsdato for kokt skinke og kyllingpålegg. Pakken med pepperskinke hadde ikke tilstrekkelig med skiver til dette uttaket.

Det ble også tatt uttak av uåpnede pakker lagret ved 4°C og 8°C ved utløpsdato, og 1 uke over utløpsdato (kun 8°C).

Påleggsskivene ble enkeltvis overført til en stomacher-pose, fortynnet 10 ganger med peptonvann og homogenisert i stomacher. Den homogeniserte løsningen dannet grunnlaget for en fortynningsrekke. Fortynningene ble platet ut og inkubert som beskrevet i avsnitt 0, med unntak av anaerob inkubering, da prøvene i lagringsforsøk 2 ble inkubert aerobt.

I tillegg ble 12 ml. av den homogeniserte løsningen fra hver prøve fryst, som senere ble benyttet i dyrkningsuavhengig analyse (se avsnitt 3.10).

Tabell 3.7 Oppsett for hver påleggspakke/ påleggsskive i lagringsforsøk 2.

Pakke nr.	Lagrings-temp.	Inkub. 2 t. daglig, 25°C	1.uttak (2 uker f/utl.d)	2.uttak (utløps-dato)	3.uttak (1 uke o/utl.d)	Vak/fryst på utløpsdato til sensorisk benkeforsøk
1	8°C		-	25 g.	-	Resten av pakken
2	8°C		-	-	25 g.	-
3	8°C		A,B,C	D,E,F	H * H,I**	G
4	8°C	✓	A,B,C	D,E,F	H H,I	G
5	4°C		25 g.	-	-	Resten av pakken
6	4°C		A,B,C	D,E,F	H H,I	G
7	4°C	✓	A,B,C	D,E,F	H H,I	G

* kokt skinke

* * kyllingpålegg

3.5.2.1 Produkter til sensorisk benkeforsøk

Etter uttak til mikrobiologisk analyse av påleggspakke nr. 1, og nr 5, ble resterende produkt vakuumert og fryst. I pakke nr. 3,4, 6 og 7 ble G-skivene vakuumert og fryst ved utløpsdato. De fryste produktene ble senere bedømt i sensorisk benkeforsøk (se avsnitt 3.6.2).

3.6 Sensorisk benkeforsøk

Produkter fra lagringsforsøk 1 og 2 ble bedømt i tre uavhengige sensoriske benkeforsøk. Sensoriske egenskaper (lukt) ble bedømt på en skala fra 0 til 9, hvor 0 er ingen tilstedeværelse av egenskapen, og 9 er den høyeste intensiteten egenskapen kan oppnå. Ved første benkeforsøk var ikke sensoriske egenskaper fastlagt på forhånd, slik at det var opp til hver enkelt paneldommer å beskrive egenskapene i produktene. I resterende benkeforsøk var egenskapene fastlagt, slik at de samme egenskapene ble bedømt av alle paneldommerne. Det ble benyttet fire paneldommere i det første sensoriske benkeforsøket, og tre av de deltok også i benkeforsøk 2 og 3. Tabell 3.9, Tabell 3.10 og Tabell 3.11 viser produktene som ble bedømt i benkeforsøk 1, 2 og 3. Pålegg ble bedømt på grunnlag av egenskapene listet opp i Tabell 3.8.

Tabell 3.8 Produktene ble bedømt på grunnlag av 8 sensoriske egenskaper.

Sensoriske egenskaper (lukt)
Syrlig
Metall
Kjøtt
Fermentert, sur
Søt
Fjøs
Kjøleskap
Emmen

3.6.1 Sensorisk bedømmelse av pålegg fra lagringsforsøk 1

Tabell 3.9 viser produktene som ble bedømt i benkeforsøk 1. Produktene er fra lagringsforsøk 1 og er kjøpt i butikk. Tre pakker kyllingpålegg og kokt skinke, og fem pakker serelat ble bedømt. I benkeforsøket ble det benyttet 2 kontrollpakker til hvert produkt, hvor den ene pakken hadde vært fryst og tint på lik linje med pakkene fra lagringsforsøk 1. Den andre pakken var en kontrollpakke som ikke hadde blitt fryst, og ble benyttet som referanse. Begge kontrollpakkene var nyinnkjøpte og hadde ikke gått ut på dato. Pakke nummer fire i tabellen nedenfor ble inkubert ved 15 °C i to uker før benkeforsøket ble utført. Seks pakker av hvert produkt, med unntak av serelat (åtte pakker) ble bedømt i benkeforsøk 1, totalt 20 påleggspakker.

De fryste produktene i lagringsforsøk 1 ble tint over natt ved 4°C dagen før benkeforsøket ble utført. Pakkene ble åpnet og produktene ble tatt ut og plassert på plastbrett omtrent 15 min. før bedømmelsen, slik at kjøttet ble temperert og at gass og eventuelt andre dufter som skyldes pakkemetoden ikke påvirket bedømmelsen av pålegget. På forhånd ble det laget randomiserte 3-sifret tall som presenterte hver enkelt påleggspakke. Disse ble festet på plastbrettet med det respektive kjøttpålegget.

Tabell 3.9 Sensorisk bedømmelse av kyllingpålegg, pepperskinke og serelat fra lagringsforsøk 1 (sensorisk benkeforsøk 1).

Oppsett	Kyllingpålegg fra butikk	Pepperskinke fra butikk	Serelat fra butikk
1.Fryst på utløpsdato	1 påleggspakke	1 påleggspakke	2 påleggspakker
2.Fryst 1 uke o/utløpsdato	1 påleggspakke	1 påleggspakke	1 påleggspakke
3.Reservepakken, lagret uåpnet ved 4°C siden innkjøp	1 påleggspakke	1 påleggspakke	2 påleggspakker
4.Utløpsdato, 15°C; inkubert uåpnet ved 15° C i 2 uker	1 påleggspakke	1 påleggspakke	1 påleggspakke
5. Kontroll, vært fryst	1 påleggspakke	1 påleggspakke	1 påleggspakke
6. Kontroll, ikke vært fryst	1 påleggspakke	1 påleggspakke	1 påleggspakke

I sensorisk benkeforsøk 2 ble røkt skinke og kokt skinke fra butikk og pepperskinke fra produsent 1 bedømt. Oppsettet i sensorisk benkeforsøk 2 var tilsvarende oppsettet i sensorisk i benkeforsøk 1. I benkeforsøk 2 ble det benyttet seks pakker av hvert produkt, inkludert to kontroller og en pakke lagret uåpnet ved 15°C to uker før benkeforsøket ble utført. Totalt 18 produkter ble bedømt i benkeforsøk 2 (Tabell 3.10).

Tabell 3.10 Sensorisk bedømmelse av røkt skinke, pepperskinke og kokt skinke fra lagringsforsøk 1 (sensorisk benkeforsøk 2).

Oppsett	Røkt skinke fra butikk	Pepperskinke fra produsent	Kokt skinke fra butikk
1.Fryst på utløpsdato	1 påleggspakke	1 påleggspakke	1 påleggspakke
2.Fryst 1 uke o/utløpsdato	1 påleggspakke	1 påleggspakke	1 påleggspakke
3. Reservepakken, lagret uåpnet ved 4°C siden innkjøp	1 påleggspakke	1 påleggspakke	1 påleggspakke
4. Utløpsdato, 15°C (inkubert uåpnet ved 15°C i 2 uker)	1 påleggspakke	1 påleggspakke	1 påleggspakke
5. Kontroll, vært fryst	1 påleggspakke	1 påleggspakke	1 påleggspakke
6. Kontroll, ikke vært fryst (referanse)	1 påleggspakke	1 påleggspakke	1 påleggspakke

3.6.2 Sensorisk bedømmelse av pålegg fra lagringsforsøk 2

I benkeforsøk 3 ble produkter fra lagringsforsøk 2 bedømt. I dette forsøket var det mindre materiale å bedømme fra de fleste pakkene, 1 påleggsskive fra pakke nr. 3, 4, 6 og 7. I tillegg var det skåret ut 25 g. fra pakke nr. 1 og 5 til mikrobiologisk analyse. På tilsvarende måte ble produktene tint over natt ved 4°C dagen før forsøket ble utført. I benkeforsøk 3 ble det ikke inkludert referanser. Da de fleste av pakkene ble representert ved kun en påleggsskive, ble det ved bedømmelsen benyttet en påleggsskive også fra pakke nr. 1 og 5, for at produktene ble bedømt ut i fra de samme betingelsene. Pakkene ble åpnet omtrent 15 min. før bedømmelse ble utført. Skivene ble brettet i fire og plassert i hver sin plastskål med lokk. Tabell 3.11 gir en oversikt over lagringsbetingelsene til produktene som ble bedømt i benkeforsøk 3.

Tabell 3.11 Oppsett over lagringsbetingelsene til produkter fra lagringsforsøk 2 som ble bedømt i sensorisk benkeforsøk (sensorisk benkeforsøk 3).

Lagringstemp.	Lagringsbetingelser for pålegg bedømt sensorisk
8°C	Lagret uåpnet til utløpsdato. Etter uttak ble resten av pakken vakuumert og fryst.
8°C	Pakken er åpnet to uker før utløpsdato. Skive G er vakuumert og fryst på utløpsdato.
8°C	Pakken er åpnet to uker før utløpsdato og skivene ble inkubert ved 25°C to timer daglig. Skive G ble vakuumert og fryst på utløpsdato.
4°C	Lagret uåpnet til utløpsdato. Etter uttak ble resten av pakken vakuumert og fryst.
4°C	Pakken er åpnet to uker før utløpsdato. Skive G er vakuumert og fryst på utløpsdato.
4°C	Pakken er åpnet to uker før utløpsdato og skivene ble inkubert ved 25°C to timer daglig. Skive G ble vakuumert og fryst på utløpsdato.

3.7 Statistiske analyser

Statistiske sammenhenger ble testet med Anova analysis i Excel, Anova Tukeys test i Minitab 16 og Fishers eksakt test. Grensen for statistisk signifikans ble satt på 5%-nivå ($p < 0,05$).

3.7.1 Statistisk analyse av data fra produsenter

Data fra prøvetakingspunktene hos produsent 1 ble samlet for hvert næringsmedie og inkuberingsforhold, til statistisk analyse. Tilsvarende utregninger ble utført for data fra prøvetakingspunkter ved produksjonslinje F (kyllingpålegg) og K (kokt skinke) hos produsent 2.

3.7.2 Statistisk analyse av data fra lagringsforsøk

I lagringsforsøk 1 ble det ikke utført gjentak av uttak for samtlige påleggsprodukter. Data fra alle produkter ble samlet og testet statistisk for endring i bakterienivå ved utløpsdato og lagring utover utløpsdato, og for forskjeller mellom næringsmedier og inkuberingsforhold.

I lagringsforsøk 2 ble data fra hver påleggstype (pepperskinke, kokt skinke og kyllingpålegg) testet i flere statistiske analyser. Statistisk signifikans ble testet mellom åpne og uåpne påleggspakker, mellom påleggspakker lagret ved 4°C og 8°C, mellom utløpsdato og 1 uke over utløpsdato, og mellom lagring ved 25°C og 4°C/ 8°C.

3.7.3 Statistisk analyse av sensoriske data

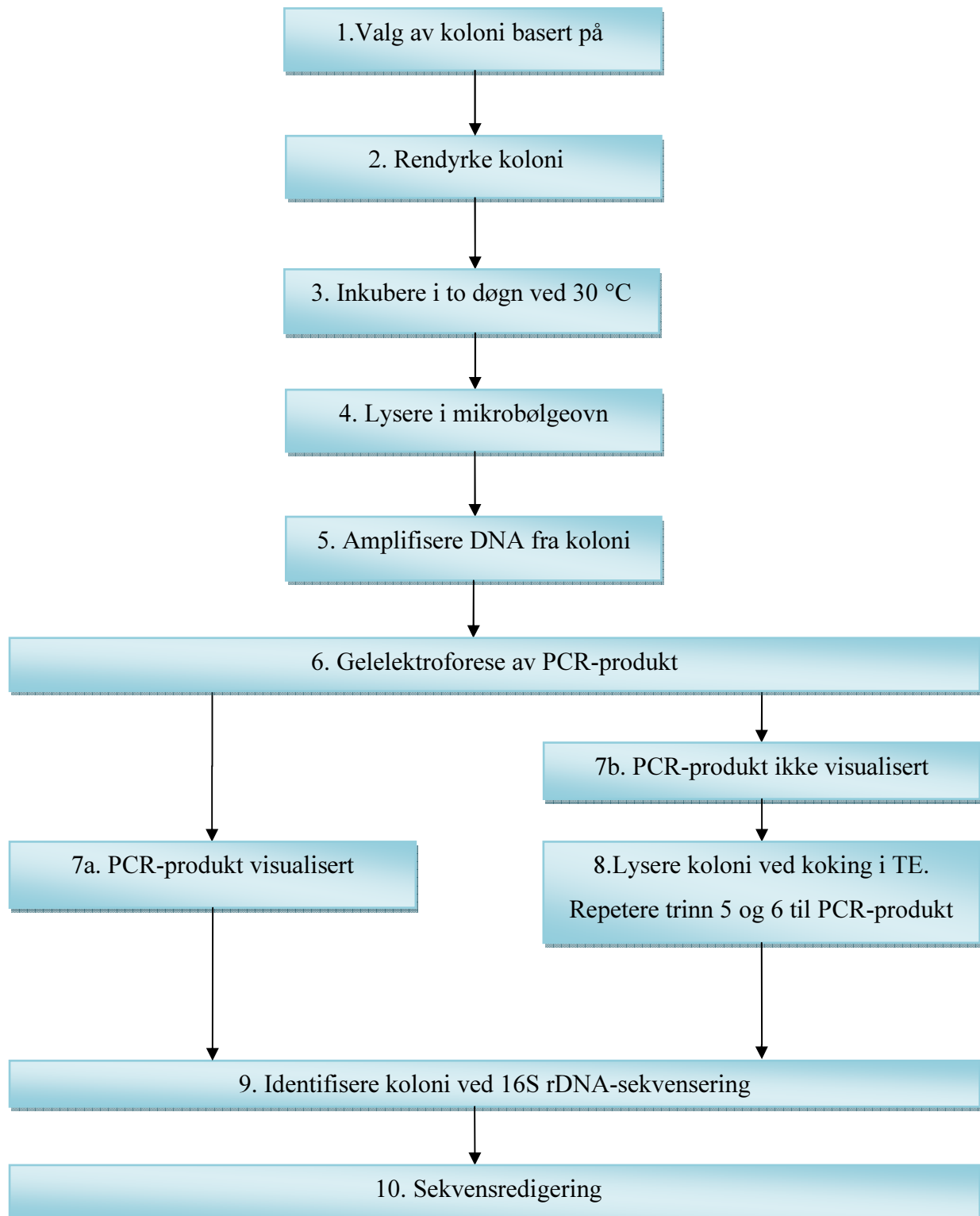
Statistisk analyse med Fishers eksakt test ble utført på data fra sensorisk bedømmelse i sammenheng med høye bakterienivå i påleggsproduktene. Sammenheng mellom høye bakterienivå ($\geq \log 7$) og negativ sensorisk score ($\leq 3 - 9$) på egenskapene fermentert (sur) lukt, og sammenheng mellom lave bakterienivå ($< \log 7$) og høy score ($\leq 3 - 9$) på den positive sensoriske egenskapen syrlig lukt.

3.7.4 Statistisk analyse av dominerende slekter i åpnet og uåpnet produkt

Sammenhengen mellom dominerende slekter (*Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Brochothrix*, *Pseudomonas* og *Leuconostoc*) i åpnet og uåpnet produkt, ble statistisk analysert med Fishers eksakt test.

3.8 Identifisering av kolonier

Grafisk fremstilling av identifiseringsprosessen er beskrevet i Figur 3.4.



Figur 3.4 Grafisk fremstilling av sekvenseringsprosessen, fra valg av koloni til identifisering.

3.8.1 Valg av kolonier til identifisering

Kolonier fra spesifikke prøvetakningspunkter i produksjonsanleggene ble valgt for identifisering. Kolonier fra produktkontaktflater ble prioritert, særlig prøver tatt før produksjonsstart, da dette er bakterier som overlever renhold. Opptil 3 kolonier med lik morfologi ble valgt fra PCA inkubert aerobt. Bakterier med unik kolonimorfologi fra MRS inkubert aerobt ble også plukket til identifisering.

Hos produsent 1 ble det påvist få bakterier før produksjonsstart. Kolonier fra utvalgte prøvetakningspunkter under produksjon av pepperskinke ble derfor i tillegg valgt til identifisering (Tabell 3.12). Totalt 19 kolonier ble identifisert fra produsent 1, samtlige fra PCA inkubert aerobt.

Tabell 3.12 Antall kolonier fra ulike prøvepunkter valgt til identifisering fra produsent 1.

Prøvetakning	Før slicing av pepperskinke	Under slicing av pepperskinke
Blå og hvite strikker	2	-
Gulv/undersiden av linjen	2	1
Sprettekniv	-	3
Skjæreblad	-	4
Påleggsavlaster	-	7

Hos produsent 2 ble det tatt prøver ved produksjonslinje F (kyllingpålegg) og K (kokt skinke). Det ble påvist bakterier ved flere av produktkontaktflater før produksjonsstart, særlig ved produksjonslinje K. Totalt 15 kolonier ble identifisert (Tabell 3.13). Ved produksjonslinje F ble det påvist 2 kolonier fra en produktkontaktflate som begge ble identifisert. Det ble ikke identifisert kolonier fra prøver tatt under slicing av pålegg. I hovedsak ble det plukket kolonier fra PCA inkubert aerobt, men en andel ble også plukket fra MRS inkubert aerobt.

Tabell 3.13 Antall kolonier fra ulike prøvepunkter valgt til identifisering fra produksjonslinjene hos produsent 2.

Prøvetakning	Før produksjon (linje K)	Før produksjon (linje F)
Hvitt transp.bånd	5	-
Valser	2	-
Røde og gule strikker	1	-
Skumvalse	4*	-
Skjæreblad	3*	-
Oppsamlingsbord	-	2

*Kolonier fra MRS inkubert aerobt.

3.8.2 Lagringsforsøk 1

I likhet med valg av kolonier fra produksjonsanleggene, ble kolonier fra kjøttpålegg i lagringsforsøk 1 og 2 valgt ut i fra tilsvarende betingelser.

Kolonier valgt til sekvensering ble hovedsakelig tatt fra pålegg platet ut på utløpsdato. Dette gjelder for hel og skivet pepperskinke, røkt skinke og kyllingpålegg. Kokt skinke og servelat var under deteksjonsgrensen ($< \log 5$ CFU/g) ved utløpsdato, og kolonier fra senere lagringstid ble valgt. Kolonien fra kokt skinke er fra 1 uke over utløpsdato, og kolonier fra servelat er fra 14 og 27 dager over utløpsdato. Antall kolonier identifisert fra hver påleggstype er oppført i Tabell 3.14.

Tabell 3.14 Antall kolonier fra pålegg i lagringsforsøk 1 valgt til identifisering.

Pålegg	Antall kolonier identifisert	Næringsmedie
Pepperskinke (skivet)	7	PCA
	7	MRS
Pepperskinke (hel)	29	PCA
Røkt skinke	5	PCA
	11	MRS
Kyllingpålegg	5	PCA
	4	MRS
Kokt sinke	1	PCA
Servelat	6	PCA
	2	MRS

3.8.3 Lagringsforsøk 2

I lagringsforsøk 2 ble pepperskinke, kyllingpålegg og kokt skinke lagret åpnet og uåpnet ved blant annet 4°C og 4°C/ 25°C. Identifisering av kolonier ved disse lagringsbetingelsene ved utløpsdato ble valgt for alle påleggstypene. For kokt skinke ble også kolonier fra pålegg lagret uåpnet ved 8°C identifisert. I Tabell 3.15 er det oppgitt antall kolonier fra hvert pålegg som ble valgt til identifisering.

Tabell 3.15 Antall kolonier fra pålegg i lagringsforsøk 2 valgt til identifisering.

Pålegg	Antall kolonier identifisert	Næringsmedie
Pepperskinke	30	PCA
	8	MRS
Kyllingpålegg	40	PCA
	7	MRS
Kokt skinke	27	PCA
	14	MRS

3.8.4 Lysering av bakterier

For å identifisere en koloni, må bakteriecellene lysere slik at DNA blir tilgjengelig for sekvensering. De utvalgte koloniene ble rendyrket og inkubert ved 30 °C i to døgn. Etter oppdyrking ble en andel av hver koloni overført til individuelle brønner i et PCR-brett. Brettet ble plassert i mikrobølgeovn og koloniene ble lysert ved full styrke i 1 min. De lyserte bakteriene ble amplifisert i PCR-reaksjon (Tabell 3.17).

3.8.5 Polymerase chain reaction (PCR)

PCR ble utført for å amplifisere et stort antall kopier av DNA fra bakterier i pålegg og produsenter til sekvensering.

Initiell aktivering ble utført for å aktivere HotStar DNA polymerase i løsningen ved 95°C i 15 min. Deretter ble dobbelttrådig DNA-fragmenter denaturert til enkelttråder, ved 94°C. Etter denaturering ble temperaturen senket til 55°C, slik at primerne kan hybridisere seg med komplimentære DNA-sekvenser på hver enkelttråd. Polymerisering av enkelttrådene ble utført ved 72°C. Denaturering, hybridisering og polymerisering ble utført i 30 omganger og antall polymeriserte DNA-tråder økte eksponensielt (Joshi & Deshpande 2011).

Oppskrift på mastermiks benyttet i PCR er beskrevet i Tabell 3.16. Et totalvolum på 20 µl ble tilsatt hver brønn med lyserte bakterier. Brettet ble spunnet ned ved 10.000 rpm i 1 min og plassert i termosykler (Veriti Thermal Cycler, Life Technologies). Tabell 3.17 viser programmet brukt for amplifisering.

Tabell 3.16 Oppskrift på mastermiks benyttet PCR

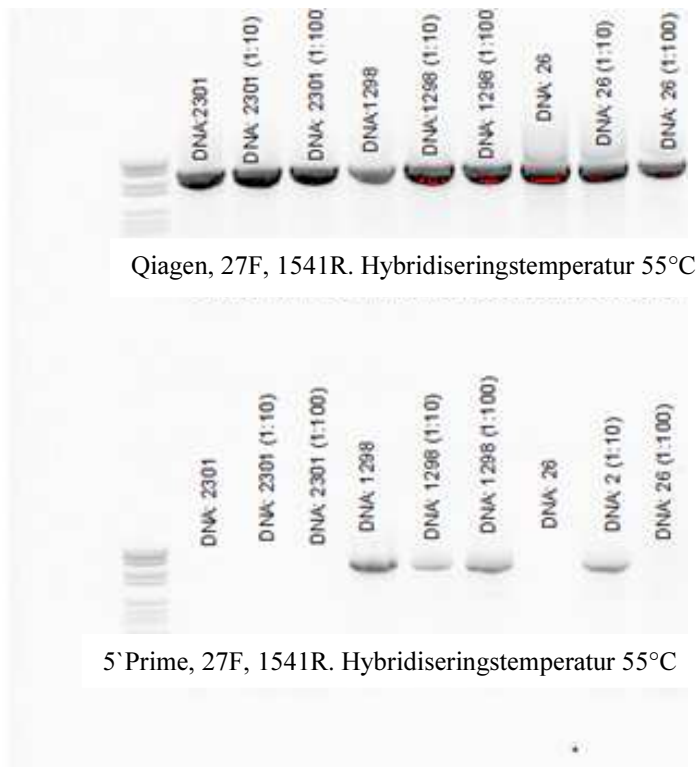
Løsning	Mengde per brønn
2 x Qiagen Multiplex PCR mastermix	10 µl
Forward primer, 27F	0,5 µl
Reverse primer, 1542R	0,5 µl
dH ₂ O	9 µl
Totalt	20 µl

Tabell 3.17 Amplifiseringsprogram for lyserte bakterier

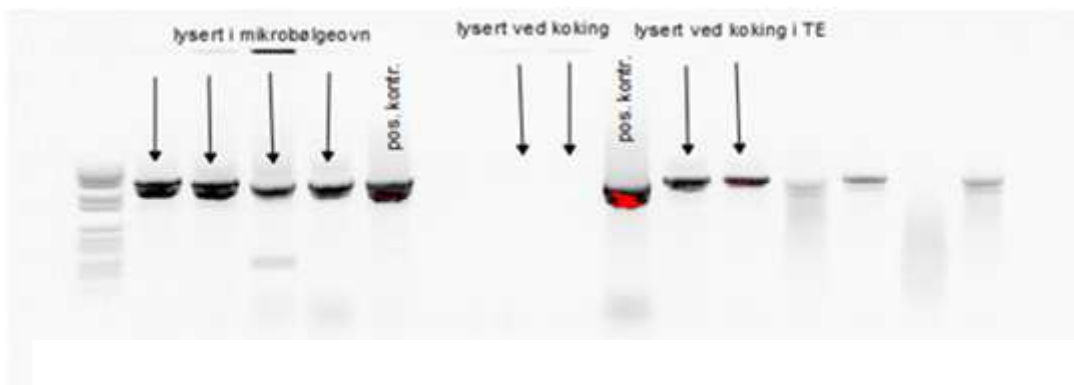
Trinn	Temperatur	Tid	Antall omganger
Initiell aktivering	95°C	15 min	1
Denaturering	94°C	30 s	
Hybridisering	55°C	90 s	30
Polymerisering	72°C	90 s	
Siste polymerisering	72°C	10 min	1

3.8.5.1 Optimalisering av PCR

Lysering i mikrobølgeovn kombinert med amplifisering ved bruk av 5 PRIME HotMasterMix (5 PRIME), hybridiseringstemperatur 55°C med primere 27 F og 1541 R, ga lite PCR-produkt. Ved bruk av Qiagen HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen) kombinert med de samme primerne, hybridiseringstemperaturen og lyseringsmetoden, ga derimot PCR-produkt på en større andel av koloniene (Figur 3.5). Resterende kolonier ble lysert ved koking i TE, etter å ha undersøkt totalt fire ulike lyseringsmetoder (Figur 3.6). Ved amplifisering ble primerne 27 F og 1541 R benyttet med hybridiseringstemperatur 55°C i kombinasjon med Qiagen HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen), uavhengig av lyseringsmetode.



Figur 3.5 Kjent DNA benyttet i amplifisering med Qiagen,- og 5' PRIME mastermix. Hybridiseringstemperatur ble satt til 55°C og primerne 27F og 1541R ble benyttet i begge amplifiseringsreaksjonene.



Figur 3.6 Et utvalg kolonier fra diverse pålegg visualisert etter amplifisering. Koloniene er lysert ved ulike metoder (i mikrobølgeovn, ved koking og ved koking i TE).

3.8.5.2 Genomisk DNA isolering med koking i TE

Lysing ved koking i TE ble utført som beskrevet i tidligere publisert litteratur (Yang *et al.* 2008) med modifikasjoner. Det ble tilsatt 50 µl TE til hver koloni i et PCR-brett. Kolonien ble løst opp/resuspendert. PCR-brettet ble plassert i termosyklus ved 99,9°C i 1 min. Deretter fryst i 3 min. ved -80°C og kokt i termosyklus ved 99,9°C i 2 min. De to sistnevnte trinnene ble utført

totalt 3 ganger. PCR-brettet ble deretter spunnet ned ved 4500 rpm i 10 min. 1 µl supernatant ble benyttet som templat, og PCR-reaksjonen ble utført som beskrevet i avsnitt 3.8.5.

3.8.6 Gelelektroforese

Agarosegelelektroforese ble utført for å verifisere PCR-produktet. Agarosegel (0,7%) ble laget ved å veie ut 0,7 g. agarose (Multi ABgarose) som ble blandet ut i 100 ml. 0,5 X TBE-buffer (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8,3) i en 200 ml. glassflaske. Løsningen ble forsiktig blandet sammen, og varmet i mikrobølgeovnen til løsningen nådde kokepunktet. Flasken ble tatt ut av mikrobølgeovnen og bunnfallet i flasken ble løst opp. Metoden ble repetert ytterligere to ganger til. Agarosegelen ble nedkjølt til 50°C i varmeskap og 7,5 µl GelRed (Biotium) ble tilsatt 75 ml agarosegel og løsningen ble helt over i støpeskål. En kamrad ble plassert øverst på gelen for å danne brønner. Etter at gelen hadde stivnet, ble den plassert i elektroforesekar som ble fylt opp med TBE-buffer. Det ble tilsatt 3,5 µl størrelsesladder, standard IV, i første brønn, og 1 µl orange G ble tilsatt 5 µl PCR-produkt i resterende brønner, som ble separert ved 100 V i 40 min. PCR-produktene ble deretter visualisert under UV-lys (Gel DocTM EZ Imager, BIO-RAD).

3.9 16S-rDNA sekvensering

Kolonier som ga PCR-produkt ble forberedt for sekvensering. Produktene ble fortynnet og deretter rensset med ExoSapIt (Affymetrix). ExoSapIt er en enzymatisk reaksjon som fjerner overflødige nukleotider og primere i PCR-løsningen, slik at de ikke forstyrrer sekvenseringen. Det ble tilsatt 2 µl ExoSapIt fortynnet 1:5 til 5 µl PCR-produkt. Løsningene ble spunnet ned i 1 min ved 1000 rpm. Brettet med ExoSapIt og PCR-produkt ble plassert i termosyklus (Veriti Thermal Cycler, Life Technologies), og programmet beskrevet i Tabell 3.18 ble benyttet.

Tabell 3.18 Programmet brukt for å behandle PCR-produktet med ExoSapIt.

Temperatur	Tid
37°C	30 min
80°C	15 min

Etter at overflødige nukleotider og primere ble fjernet fra PCR-løsningen, ble den siste nukleotiden i 3'-ende av fragmentene i PCR-produktet merket med fluoriserende farge. Prosessen ble utført med BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Life technologies). Løsningene listet opp i Tabell 3.19 ble overført til et optisk mikrotiterbrett. En totalmengde på 10 µl ble tilsatt hver brønn. Mikrotiterbrettet ble spunnet ned i 1 min ved 1000 rpm og plassert i

termosykler (Veriti Thermal Cycler, Life Technologies). Tabell 3.20 viser programmet som ble brukt for å inkorporere fluorosentene.

Tabell 3.19 Løsninger brukt i sekvenserings-PCR per brønn.

Løsning	Mengde per brønn
Big dye buffer	1,5 µl
Big dye 1.1	1,0 µl
Primer, 3,2 µM Mangala F	1,0 µl
dH ₂ O	5,5 µl
PCR-produkt	1,0 µl
Totalt	10 µl

Tabell 3.20 Programmet brukt for å inkorporere fluorosenter i sekvenserings-PCR.

Temperatur	Tid	Omganger
96°C	15 s	25
60°C	4 min	

De overflødige fluorosentene som ikke ble bundet til DNA, ble felt ut ved å bruke BigDye XTerminator® Purification Kit (Applied Biosystems®), som inneholder XTerminator-løsning og SAM-løsning. 10 µl XTerminator og 45 µl SAM ble tilsatt i hver brønn med PCR-produkt i mikrotiter-brettet, som ble ristet ved 1500 rpm i 30 min. Direkte etter risting ble brettet spunnet ned ved 2500 rpm i 2 min. Sekvensering ble utført på platformen 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

3.9.1 Sekvensredigering

Sekvensene ble redigert i sequence skanner og i Bioedit, for å fjerne uønsket støy i starten og i slutten av sekvensene. Deretter ble de sammenlignet med kjente sekvenser på nettsiden ribosomal database project (RDP).

3.10 Dyrkingsuavhengig analyse (Miseq)

Grunnet tidsbegrensninger ble dyrkingsuavhengig analyse utført av ingeniør Merete Rusås Jensen ved Nofima. Deler av utførelsen ble observert.

High-throughput sekvensering ble utført på pålegg fra lagringsforsøk 1 og 2. De fryste påleggsprøvene (stomacher-løsningene) ble tint på is. Mengde prøve som ble spunnet ned til

pellet ble avgjort på grunnlag av log CFU/ml i hver enkelt påleggsprøve. For prøver med log CFU/ml >6 ble det spunnet ned 1 ml, og prøver med log CFU/ml ≤6 ble det brukt 5 ml. Fra lagringsforsøk 2 ble det laget en samleprøve av 3 prøver (3 påleggsskiver) fra samme uttaksdato (1 uke før utløpsdato, utløpsdato og 1 uke uke over utløpsdato). Samleprøvene hadde et totaltvolum på 1 eller 5 ml, basert på log CFU/ml, som beskrevet ovenfor. Prøvene ble spunnet ned ved 13000 x g i 5 min.

Pelleten ble rensed med QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) for å isolere DNA ved å fjerne PCR-inhibitorer. Det ble tilsatt 500 µl ASL buffer til pellet fra QiaAmp DNA Stool kit (Qiagen). Den løste pelleten ble overført til et fastprep rør (matrix E) og knust ved 1 x 40 s. ved 6m/s. Løsningen ble sentrifugert, tilsatt 500 µl ASL buffer og ristet på vortex. Etter inkubering ved 70°C i 5 min., ble løsningen sentrifugert ved 14000 x g i 5 min. Supernatanten ble overført til et nytt 2 ml.- rør og tilsatt 400 µl ASL buffer. Protokollen QIAmp DNA Stool Handbok 06/2012, ble deretter fulgt fra punkt 5 til punkt 18. I punkt 19 ble elueringsvolumet på Buffer AE redusert til 100 µl.

Renset DNA ble amplifisert i triplikater med PCR. Metoden ble utført som beskrevet i publisert litteratur (Costello *et al.* 2009) med modifikasjoner. Tabell 3.21 og Tabell 3.22 beskriver henholdsvis oppskrift på mastermix og PCR-programmet brukt ved amplifisering. Den samme forward primeren ble tilsatt alle prøvene. Individuelle revers primere med 12 pb barcode ble tilsatt hver enkelt prøve. Metoden ble utført som beskrevet i publisert litteratur (Caporaso *et al.* 2012).

Tabell 3.21 Oppskrift på mastermix brukt i PCR amplifisering i triplikater.

Løsning	Mengde
5 Prime HotMasterMix	10µl
Forward primer, 515F (10 µM)	0,5µl
Revers primer m/ unik barcode (5 µM)	1µl
DNA (ufortynnet)	1µl
Molecular grade H ₂ O	12,5µl

Tabell 3.22 Program brukt i amplifisering ved dyrkingsuavhengig analyse.

Trinn	Temperatur	Tid	Antall omganger
Initiell aktivering	94°C	3 min.	1
Denaturering	94°C	45 s.	35
Hybridisering	50°C	60 s.	
Polymerisering	72°C	90 s.	
Siste polymerisering	72°C	10 min	1

Gelelektroforese av PCR-produktet ble utført for å bekrefte amplifisering. Elektroforese ble utført som beskrevet i avsnitt 3.8.6.

Triplikatene av samme prøve ble slått sammen etter amplifisering og gelelektroforese, og renset med Agencourt AMPure XP. Det ble tilsatt 90 µl AMPure XP til 50 µl PCR produkt. Utførelsen er beskrevet i Agencourt AMPure protokoll for 96-brønners plate. Dette fjerner uinkorporerte dNTP-er, primere, primer-dimere, salter og de minste DNA-fragmentene i løsningen.

Kvantifisering av renset PCR produkt ble utført med Quant-iT Picogreen ds-DNA Assay Kit (Invitrogen). Det ble dannet duplikater av prøvene, og utførelse av kvantifiseringen er beskrevet i protokoll fra leverandør. Kun dobbeltrådet DNA i løsningen blir målt. Prøver med lavt bakterietall (under 9,7 ng/ml) blir fjernet fra løsningen.

Fra hver prøve ble det tatt ut et volum som tilsvarer 50 ng DNA. Prøvene med unike barkoder ble slått sammen i ekvivalente konsentrasjoner. Samleprøven ble renset med Agencourt AMPure XP, som beskrevet ovenfor. Den rensede samleprøven ble kvantifisert med Quant-iT Picogreen ds-DNA Assay Kit (Invitrogen). Utførelse er beskrevet i protokoll fra leverandør. Samleprøven ble målt på Nanodrop (Saveen Werner) for å oppnå 260/280 forhold. Etter kvantifisering ble samleprøven fortynnet til 4 nM, hvor det ble benyttet 7 pM samleprøve og 10% PhiX spike (kontroll-DNA). Hensikten med PhiX spike er å øke diversiteten i samleprøven. Read 1 sequence primer (forward primer), read 2 sequence primer (reverse primer) og index primer (leser barkode) ble fortynnet til 0,5 µM og tilsatt i "Reagent Cartridge" sammen med samleprøven (Caporaso *et al.* 2012). Sekvenseringsprosessen ble utført på platformen MiSeq Desktop Sequencer (Illumina).

3.11 DNA fingerprinting av isolater

Grunnet tidsbegrensninger ble DNA fingerprinting utført av ingeniør Signe Marie Drømtorp ved Nofima.

DNA fingerptinting (typing) ble utført på et utvalg av isolater fra pålegg og fra overflater hos produsent 1 og 2, til stammenivå. Typingen ble utført med to PCR-baserte metoder; Random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) og repetetive sequence-based PCR (rep-PCR). Isolater fra slektene *Lactobacillus*, *Pseudomonas* og *Leuconostoc* ble påvist ved 16S-rDNA sekvensering fra både pålegg og fra overflater hos produsent 1 og 2. Disse isolatene ble derfor valgt til typing. Fingerprintingmetodene inkluderer isolering av DNA, PCR og gelelektroforese.

3.11.1 Isolering av DNA

Kolonier fra aktuelle prøver ble plukket og dyrket opp i buljong (Nutrient Broth (NB) eller MRS, avhengig av hvilket næringsmedie koloniene ble plukket fra). Koloniene ble inkubert ved 20°C i 5-10 dager, avhengig av vekst. DNA ble deretter isolert ved bruk av Genomic DNA purification Kit (Bacterial Ver. 5 #85171 – Edge Biosystems) med modifikasjoner.

Bakteriekulturen (1,5-3 ml) ble sentrifugert ved 3500 rpm i 10 min. etter oppdyrking. Supernatanten ble fjernet og pelleten vasket i 1 ml. TES. Pelleten ble resuspendert i 360 µl speroplast-løsning, før 20 µl lysozym (40 mg/ml), 16 µl RNase A (19µg/ml), og 8 µl mutanolysin (5000 U/ ml) ble tilsatt. Løsningen ble inkubert ved 37°C i 30 min, og 20 µl proteinase K (20 mg/ml) ble tilsatt, og løsningen ble inkubert ytterligere 10 min. ved 37°C. Deretter ble 100 µl av henholdsvis Lysis buffer 1 og Lysis buffer 2 tilsatt, og løsningen ble resuspendert og inkubert ved 65°C i 5 min. Henholdsvis 100 µl av løsningene Advamax™ Beads og Extraction buffer ble tilsatt og rørene ble vendt i ca 2-3 min, og plassert på vortex i 10 sekunder. Rørene ble sentrifugert i en mikrosentrifuge ved 13000 rpm i 20 min. Supernatanten (blant annet DNA) ble overført til et rent eppendorfrør, og 800 µl isopropanol ble tilsatt, og røret ble vendt flere ganger, slik at løsningene ble godt blandet. Rørene ble inkubert i romtemperatur i 10 min for å felle ut DNA, og sentrifugert i 10 min ved 13000 rpm. Supernatanten (isopropanolen) ble fjernet og 500 µl 70% EtOH (RT) ble tilsatt pelleten. Røret ble vendt 2-3 ganger, og sentrifugert ved 13000 rpm i 1 min. EtOH ble fjernet og pelleten ble tørket i røret uten lokk i ca 30 min. DNA ble deretter løst i 50 µl 0,1 x TE. Konsentrasjon og kvalitet på DNA ble kontrollert ved hjelp av NanoDrop (Saveen Werner).

3.11.2 Random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR)

Metoden ble utført som beskrevet av Ercolini et al. Etter isolering av DNA ble løsningene i Tabell 3.23, inkludert primeren XD5 (5'-CTGGCGGCTG-3'), benyttet i RAPD-PCR. Et totaltvolum på 25 µl ble overført til hver brønn i et PCR-brett. Etter applisering ble brettet spunnet ned i 1 min ved 10000 rpm og plassert i termosyklus (Veriti Thermal Cycler). I Tabell 3.24 er det beskrevet PCR-programmet som ble benyttet i RAPD-PCR (Ercolini *et al.* 2009).

Tabell 3.23 Løsninger og mengde benyttet i RAPD-PCR.

Løsning	Mengde
10 x TaqPolymerase Bf	2,5 µl
MgCl ₂ 25 mM (sluttkons. 2,5 µM)	2,5 µl
dNTP 10 mM (sluttkons. 1,2 mM)	3 µl
Primer XD5 10 µM (sluttkons. 1,08 µM)	2,7 µl
TaqDNA polymerase (invitrogen)	0,5 µl
DNA templat (20 ng/µl)	1 µl
dH ₂ O	12,8 µl
Totalt	25 µl

Tabell 3.24 Program benyttet i RAPD-PCR.

Trinn	Temperatur	Tid	Antall omganger
Initiell aktivering	94°C	1 min	1
Denaturering	94°C	1 min	
Hybridisering	31°C	1 min	30
Polymerisering	72°C	2 min	
Siste polymerisering	72°C	7 min	1

Etter amplifisering ble gelelektroforese utført som beskrevet i avsnitt 3.8.6, med modifikasjoner. Det ble tilsatt 5 µl Orange G til 17 µl PCR-produkt. Amplifiseringsproduktet ble separert på 1,5% agarosegel ved 120 V i 2 timer.

3.11.3 Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR)

Etter isolering av DNA, som beskrevet i avsnitt 3.11.1, ble metoden utført som beskrevet av Y. Zh. Xu et al. Primeren (GTG)₅ (5'-GTG GTG GTG GTG GTG -3') ble benyttet i rep-PCR. Løsningene brukt i amplifiseringsreaksjonen er oppført i Tabell 3.25. Et totaltvolum på 25 µl ble overført til hver brønn i et PCR-brett. Etter applisering ble brettet spunnet ned i 1 min ved 10000

rpm og plassert i termosyklus (Veriti Thermal Cycler). I Tabell 3.26 er det beskrevet PCR-programmet som ble benyttet i rep-PCR (Xu *et al.* 2010).

Tabell 3.25 Løsninger og mengde benyttet i rep-PCR.

Løsning	Mengde
10 x TaqPolymerase Bf	2,5 µl
MgCl ₂ 25 mM (sluttkons. 2,0 µM)	2 µl
dNTP 10 mM (sluttkons. 1,2 mM)	3 µl
Primer (GTG) ₅ 10 µM (sluttkons. 0,8 µM)	2,7 µl
TaqDNA polymerase (invitrogen)	0,25 µl
DNA templat (20 ng/µl)	2 µl
dH ₂ O	13,5 µl
Totalt	25 µl

Tabell 3.26 Program benyttet i rep-PCR.

Trinn	Temperatur	Tid	Antall omganger
Initiell aktivering	94°C	4 min	1
Denaturering	94°C	30 s.	
Hybridisering	45°C	1 min.	30
Polymerisering	65°C	8 min.	
Siste polymerisering	65°C	16 min.	1

Etter amplifisering ble gelelektroforese utført som beskrevet i avsnitt 3.8.6, med modifikasjoner. Det ble tilsatt 3 µl Orange G til 10 µl PCR-produkt. Amplifiseringsproduktet ble separert på 1,3% agarosegel ved 120 V i 90 min.

4 Resultater

4.1 Prøvetakning av overflater hos kjøttbedrifter

Det ble tatt prøver hos to produsenter før produksjonsstart og under produksjon av kjøttpålegg. Pepperskinke og røkt skinke ble produsert av produsent 1, mens produksjon av kokt skinke, kyllingpålegg og savelat ble utført av produsent 2. Prøvene ble platet ut på PCA og MRS, og begge næringsmediene ble inkubert både aerobt og anaerobt.

Slicing og pakking av pepperskinke, etterfulgt av røkt skinke ble utført ved den samme produksjonslinjen. Vask av linjen ble utført mellom slicing av påleggstypene, ved å sprite transportbånd, strikker og andre produktkontaktflater. Kokt skinke og kyllingpålegg ble prosessert ved ulike produksjonslinjer hos produsent 2, henholdsvis linje K og linje F.

Det ble funnet få bakterier på overflater før produksjonsstart hos både produsent 1, og ved begge produksjonslinjene hos produsent 2 (Tabell 4.1, Tabell 4.2 og Tabell 4.3). For prøver platet ut på PCA inkubert aerobt, var bakterienivået $< \log 1 \text{ CFU/cm}^2$ for 7 av 8 produktkontaktflater hos produsent 1, og 3 av 5 produktkontaktflater ved begge produksjonslinjene hos produsent 2. Av produktkontaktflater før produksjonsstart, ble høyeste bakterienivå funnet på blå og hvite strikker ($\log 2 \text{ CFU/cm}^2$) hos produsent 1. Ved produksjonslinje K (kokt skinke) var det høye bakterienivå på skjæreblad ($\log 1,78 \text{ CFU/cm}^2$) og på røde og gule strikker ($\log 2 \text{ CFU/cm}^2$). Oppsamlingsbord ($\log 1,42 \text{ CFU/cm}^2$) tilknyttet produksjonslinje F (kyllingpålegg) var den eneste produktkontaktflaten det ble påvist bakterier før produksjonsstart (Figur 4.1, Figur 4.2 og Figur 4.3).

Under produksjon ble det påvist høyere bakterienivå på overflater hos begge produsentene. Bakterienivået fra produktkontaktflater under produksjon er lavest for kokt skinke, hvor 2 av 4 prøvepunkter var under deteksjonsgrensen. For kyllingpålegg var 3 av 5 punkter $< \log 2,5 \text{ CFU/cm}^2$. Bakterienivået for røkt skinke for 6 av 8 punkter var $> \log 4 \text{ CFU/cm}^2$, og høyest for pepperskinke hvor 5 av 8 punkter er $> \log 5 \text{ CFU/cm}^2$.

Tabell 4.1 Gjennomsnittlig bakterienivå på overflater før produksjonsstart og under produksjon av pepperskinke og røkt skinke hos produsent 1. Verdiene er oppgitt i log CFU/cm².

Dyrkningsforhold	Produktkontaktflater			Andre overflater		
	Før produksjonsstart	Under prod. av pepperskinke	Under prod. av røkt skinke	Før produksjonsstart	Under prod. av pepperskinke	Under prod. av røkt skinke
PCA aerobt	0,23 (-0,70-3,10)*	5,95 (4,76-7,30)	4,70 (2,95-6,37)	0,12 (0-1,44)	4,49 (1,00-6,88)	2,50 (1,00-3,99)
PCA anaerobt	0,26 (-0,70-1,70)	5,86 (4,77-6,80)	4,74 (3,52-6,57)	0,34 (0-2,3)	3,12 (1,00-4,41)	2,70 (1,00-4,39)
MRS aerobt	0,36 (-0,70-3,02)	5,45 (3,52-6,85)	4,34 (2,85-5,99)	0,82 (0-1,78)	4,29 (1,00-6,49)	2,68 (1,00-4,36)
MRS anaerobt	0,48 (-0,60-2)	5,75 (4,73-6,71)	4,59 (2,82-5,99)	1,02 (0-2,57)	3,75 (1,00-6,79)	2,19 (1,30-3,07)

* Gjennomsnittlig bakterienivå (log CFU/cm²) av prøvetakningspunkter inkubert ved samme betingelser. Verdiene i intervallet er laveste og høyeste bakterienivå for hvert prøvetakningspunkt. For prøver som ikke ga vekst etter inkubering er laveste verdi for deteksjon (<log 5 CFU/g) benyttet i utregningene.

Det var ikke signifikante forskjeller i bakterienivå (log CFU/cm²) mellom næringsmedier og inkuberingsforhold (P=0,90) fra prøvene tatt av produksjonslinjen hos produsent 1.

Tabell 4.2 Gjennomsnittlig bakterienivå på overflater før produksjonsstart og under produksjon av kokt skinke hos produsent 2. Verdiene er oppgitt i log CFU/cm².

Dyrkningsforhold	Produktkontaktflater		Andre overflater	
	Før produksjonsstart	Under prod. av kokt skinke	Før produksjonsstart	Under prod. av kokt skinke
PCA aerobt	0,82 (-0,70-2,00)*	1,87 (1,30-2,40)	2,05 (1,18-2,48)	2,17 (0,92-3,93)
PCA anaerobt	0,81 (-0,70-1,78)	1,68 (0,30-2,40)	1,52 (0,08-2,48)	2,14 (0,92-4,30)
MRS aerobt	0,70 (-0,70-1,78)	1,58 (0,30-2,40)	0,99 (-0,70-2,48)	1,59 (0,92-2,30)
MRS anaerobt	0,44 (-0,70-1,40)	1,65 (0,30-2,48)	1,00 (-0,22-2,48)	2,06 (0,92-4,78)

* Gjennomsnittlig bakterienivå (log CFU/cm²) av prøvetakningspunkter inkubert ved samme betingelser. Verdiene i intervallet er laveste og høyeste bakterienivå for hvert prøvetakningspunkt. For prøver som ikke ga vekst etter inkubering, er laveste verdi for deteksjon (<log 5 CFU/g) benyttet i utregningene.

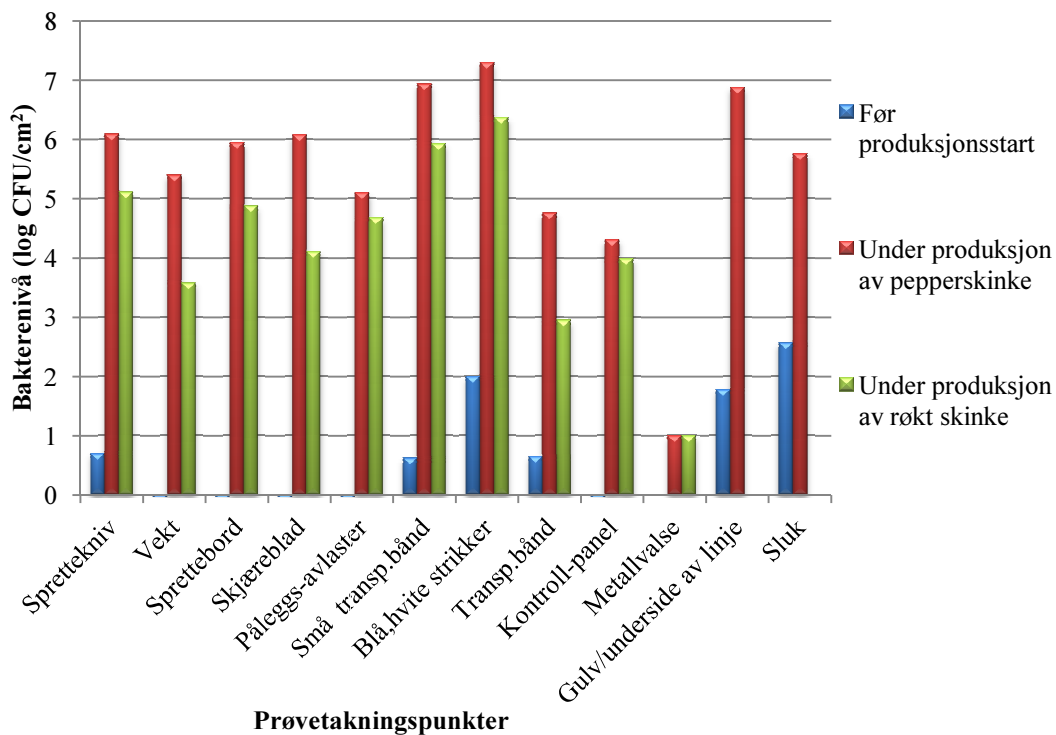
Tabell 4.3 Gjennomsnittlig bakterienivå på overflater før produksjonsstart og under produksjon av kyllingpålegg hos produsent 2. Verdiene er oppgitt i log CFU/cm².

Dyrkningsforhold	Produktkontaktflater		Andre overflater	
	Før produksjonsstart	Under prod. av kyllingpålegg	Før produksjonsstart	Under prod. av kyllingpålegg
PCA aerobt	0,67 (-0,70-1,42)*	2,06 (0,92-2,35)	1,76 (0,30-2,57)	2,95 (2,57-3,28)
PCA anaerobt	0,71 (-0,70-1,62)	2,09 (0,92-2,60)	1,76 (0,30-2,57)	2,97 (2,55-3,37)
MRS aerobt	0,63 (-0,70-1,40)	1,88 (0,92-2,40)	1,14 (0,30-2,57)	1,98 (1,45-2,24)
MRS anaerobt	0,28 (-0,70-1,40)	2,13 (0,92-2,40)	1,01 (0,30-2,57)	1,63 (0,92-2,44)

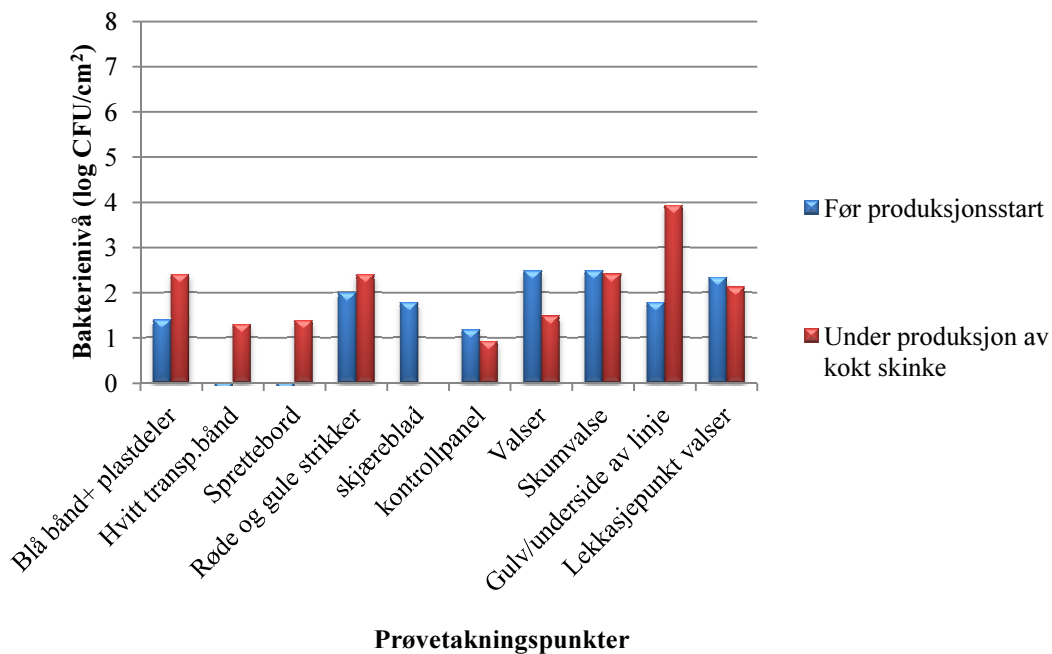
* Gjennomsnittlig bakterienivå (log CFU/cm²) av prøvetakningspunkter inkubert ved samme betingelser. Verdiene i intervallet er laveste og høyeste bakterienivå for hvert prøvetakningspunkt. For prøver som ikke ga vekst etter inkubering, er laveste verdi for deteksjon (<log 5 CFU/g) benyttet i utregningene.

Det var ikke signifikante forskjeller i bakterienivå (log CFU/cm²) mellom næringsmedier og inkuberingsforhold ved linje F (P=0,985) eller ved linje K (P=0,63) hos produsent 2. Det ble heller ikke påvist statistisk signifikans i bakterienivå (log CFU/cm²) mellom næringsmedier og inkuberingsforhold i en samleprøve fra begge produsentene (P=0,96). Videre i resultatdelen er det derfor presentert data fra PCA inkubert aerobt.

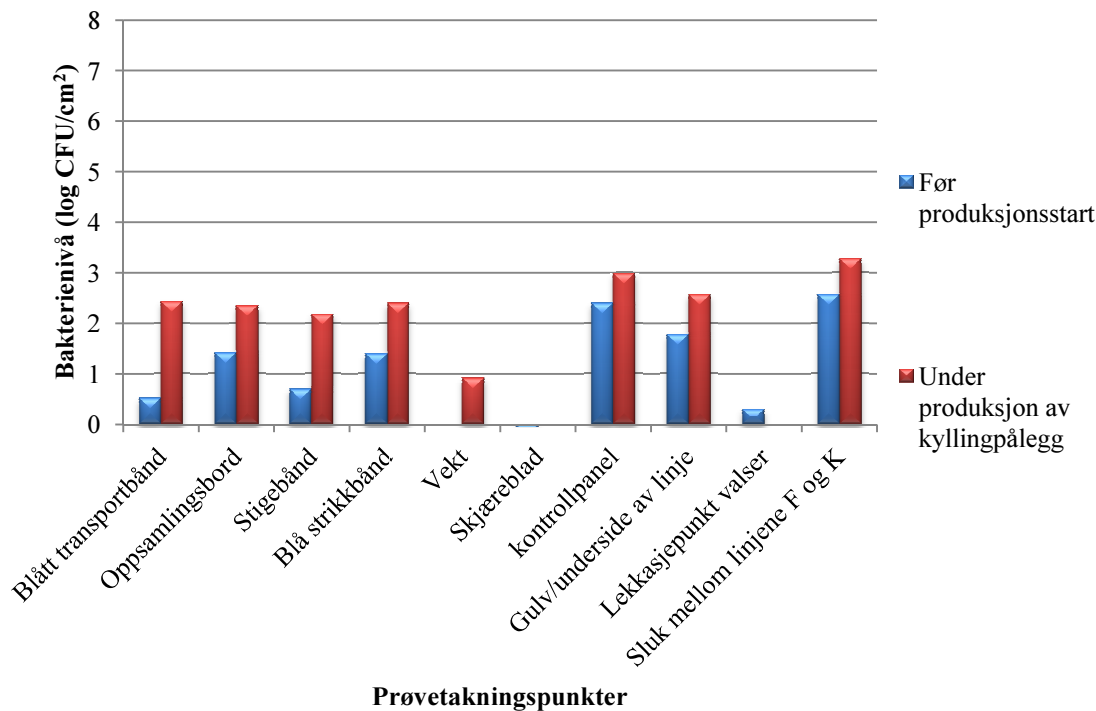
Bakterienivå (log CFU/cm²) fra overflater før og under produksjon av kjøttpålegg hos produsent 1 og 2 er vist i Tabell 4.1, Tabell 4.2 og Tabell 4.3. Det ble tatt prøver av 12 punkter hos produsent 1, og 20 prøver hos produsent 2, 10 fra hver produksjonslinje. For begge produsenter var bakterienivået lavt etter renhold, men økte i løpet av produksjon. Bakterienivå var særlig høyt under produksjon av pepperskinke hos produsent 1 (<log 7,3 CFU/cm²). For kokt skinke og kyllingpålegg var høyeste bakterienivå henholdsvis log 3,9 CFU/cm² og log 2,9 CFU/cm². For alle flater prøvetatt før produksjonsstart hos begge produsenter var bakterienivået lavt (<log-0,70- 3,10 CFU/cm²).



Figur 4.1 Bakterienivå (log CFU/cm²) på prøvetakningspunkter tatt før og under produksjon av pepperskinke og røkt skinke hos produsent 1. Verdiene er fra PCA inkubert aerobt.



Figur 4.2 Bakterienivå (log CFU/cm²) på prøvetakningspunkter hos produsent 2 for produksjonsstart og under produksjon av kokt skinke. Verdiene er fra PCA inkubert aerobt.



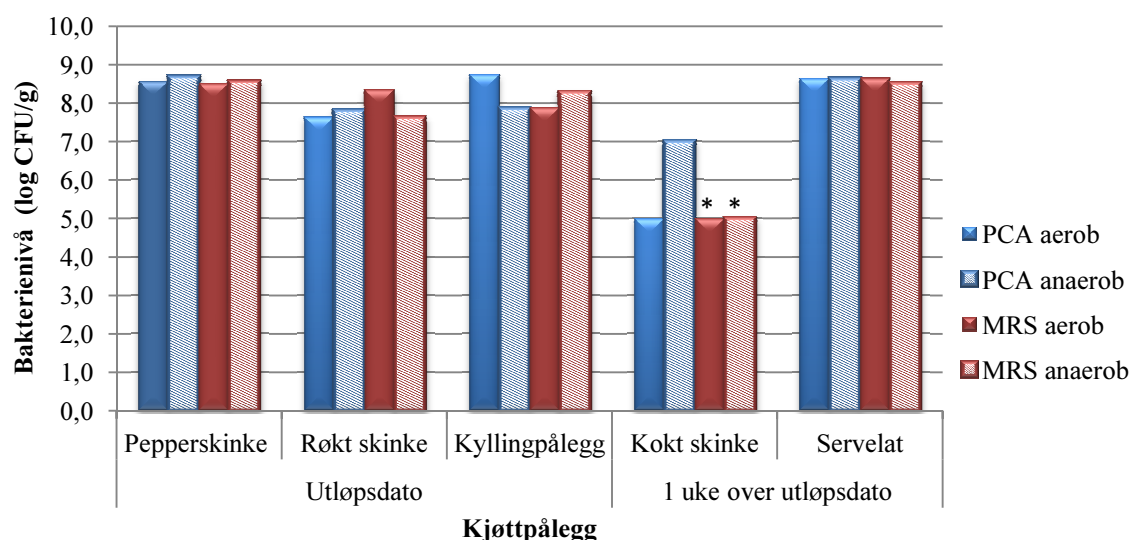
Figur 4.3 Bakterienivå (log CFU/cm²) på prøvetakningspunkter hos produsent 2 før produksjonsstart og under produksjon av kyllingpålegg. Verdiene er fra PCA inkubert aerobt.

4.2 Lagringsforsøk 1

Det første lagringsforsøket ble gjennomført med hensikt på å bestemme nivå og diversitet i bakterieflora, og sensoriske egenskaper i kjøttpålegg. Påleggsproduktene ble lagret ved 4°C uåpnet i originalemballasje, og uttak til mikrobiologiske analyser ble utført på utløpsdato, 1 uke over utløpsdato, og etter enkle sensoriske bedømmelser. Det ble tatt uttak av en ny påleggspakke ved hver uttaksdato. En andel av alle påleggsskivene i pakken ble benyttet til uttak (totalt 25 g).

4.2.1 Bakterienivå i kjøttpålegg

Bakterienivåer (log CFU/g) ved utløpsdato for pepperskinke, røkt skinke og kyllingpålegg er vist i Figur 4.4. Verdiene er fra PCA og MRS, inkubert aerobt og anaerobt. Verdiene for kokt skinke og savelat er fra 1 uke over utløpsdato, da bakterienivået var under deteksjonsgrensen (<log 5 CFU/g) ved utløpsdato. For kokt skinke ble det påvist bakterievekst på PCA inkubert aerobt og anaerobt 1 uke over utløpsdato. De andre inkuberingsbetingelsene var under deteksjonsgrensen (<log 5 CFU/g).

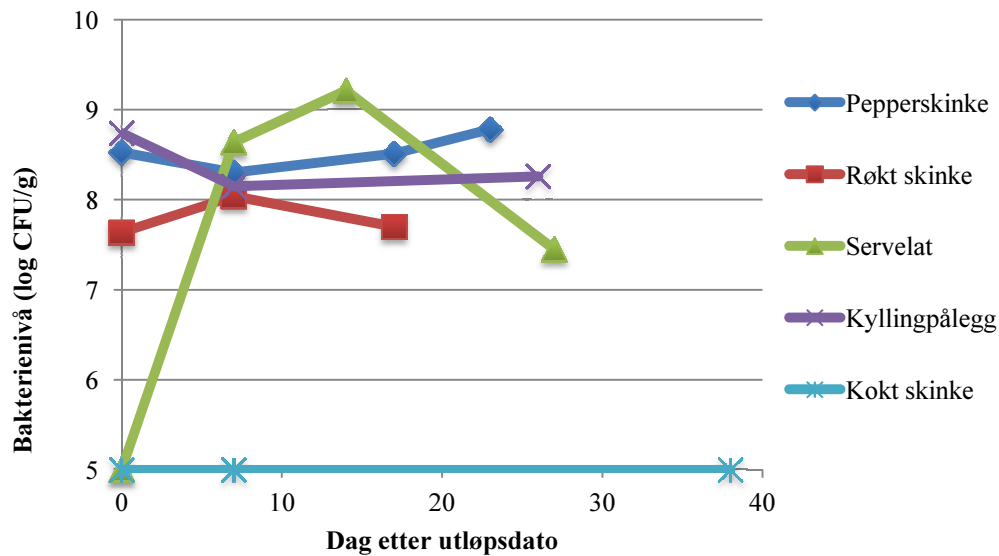


Figur 4.4 Bakterienivå (log CFU/g) for kjøttpålegg ved utløpsdato og 1 uke over utløpsdato. *Under deteksjonsgrensen (<log 5 CFU/g).

Det var ikke signifikant økning ($p > 0,05$) i bakterienivå ved lagring utover utløpsdato, i en statistisk test av alle påleggsprodukter samlet. Det var heller ikke signifikante forskjeller ($p > 0,05$) mellom næringsmedier og inkuberingsbetingelser i bakterienivå. Videre i resultatene er det derfor presentert verdier fra PCA inkubert aerobt. Data fra resterende dyrkningsbetingelser er presentert i Vedlegg 2.

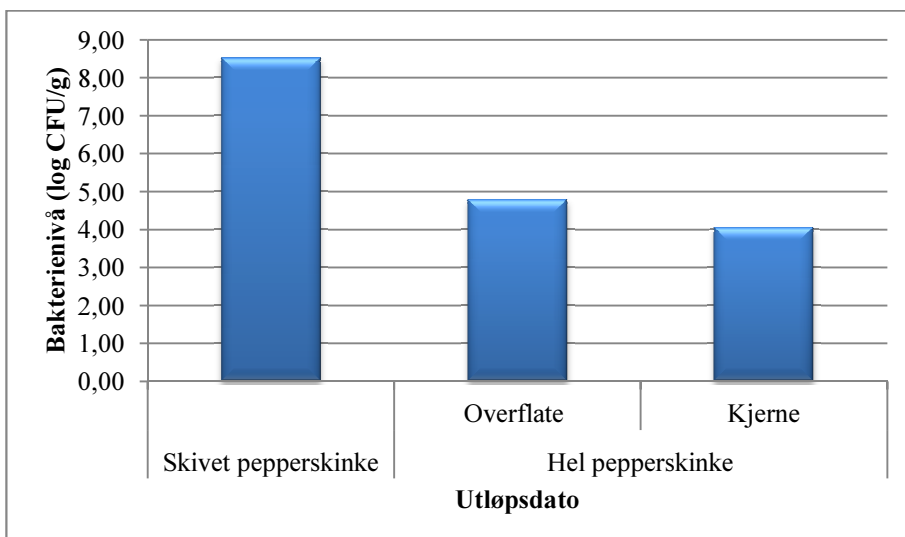
Bakterienivåer (log CFU/g) i de ulike påleggstypene ved alle uttaksdatoer er gitt i Figur 4.5. Bakterienivået (PCA aerobt) for savelat og kokt skinke var under deteksjonsgrensen (< log 5 CFU/g.) ved utløpsdato. Kokt skinke forble under deteksjonsgrensen ved både 7 og 38 dager over utløpsdato. Bakterienivået i de øvige påleggsproduktene nådde kintall på ca log 8-9 CFU/g, som ikke økte videre i lagringsperioden. Ved lengere tids inkubering, ble det observert en nedgang i bakterienivå for savelat og røkt skinke.

Det ble også utført mikrobiologiske analyser av en pakke savelat som var misfarget (A2). Pakken var fra en annen batch enn de nevnte ovenfor. Bakterienivået for misfarget savelat ved utløpsdato var log 8,5 CFU/g på PCA inkubert aerobt (Tabell Vedlegg 2 a). Misfarget savelat er ikke vist i Figur 4.5.



Figur 4.5 Bakterienivå (log CFU/g; PCA, aerob inkubering) for pålegg lagret uåpnet ved 4°C. Dag 0 er utløpsdato. Bakterienivå på kokt skinke var under deteksjonsgrensen (<log 5 CFU/g) ved alle uttak.

Det ble tatt uttak av både skivet og hel pepperskinke på utløpsdato (Figur 4.6). Fra hel pepperskinke ble det tatt prøver fra overflaten og fra kjernen. Det var lavest bakterienivå i kjernen (log 4,1 CFU/g), og høyest på overflaten (log 4,8 CFU/g). Skivet pepperskinke har nærmere 100.000 ganger mer bakterier sammenlignet med hel pepperskinke (log 8,5 CFU/g).



Figur 4.6 Bakterienivå (log CFU/g) i skivet og hel pepperskinke ved utløpsdato.

4.2.2 Sensorisk bedømmelse av lagret kjøttpålegg

Det ble gjennomført sensorisk bedømmelse (lukt) av påleggsproduktene (pepperskinke, røkt skinke kokt skinke, kyllingpålegg og servelat) ved ulike lagringstider (Figur 4.7- Figur 4.11). Nyinnkjøpt pålegg fra butikk ble benyttet som referanse. Detaljert beskrivelse om oppsett og utførelse er oppgitt i Materialer og metoder, avsnitt 3.6. Resultatene er basert på gjennomsnittet av sensorisk bedømmelse utført av 3 paneldommere.

Referansene hadde mellom 17 og 29 dager igjen til utløpsdato da sensorisk bedømmelse ble utført. Generelt sett viste pålegg ved utløpsdato og referansene små sensoriske ulikheter. En tendens i alle påleggstypene, med unntak av kokt skinke, var nedgang i syrlig lukt og kjøttlukt i produkter lagret over lengre tid, samtidig som at fermentert lukt økte.

Figur 4.7 viser sensoriske egenskaper til pepperskinke fra butikk. Referansepakken hadde 17 dager igjen til utløpsdato ved bedømmelse. De sensoriske egenskapene er relativt stabile over tid, med unntak av syrlig lukt som ble redusert, samtidig som at fermentert lukt, søt lukt og fjøslukt økte. I Figur Vedlegg 3 a er det vist sensorisk bedømmelse av pepperskinke fra produksjonsanlegg. Den største forskjellen i sensorikk mellom pepperskinke fra butikk og fra produksjonsanlegg, er ved 17 dager over utløpsdato fra produksjonsanlegg, har lav intensitet i fermentert lukt (ca 2), mens 6 dager senere har pepperskinke fra butikk høyere intensitet ved samme egenskap (ca 7).

For kokt skinke (Figur 4.8) hadde egenskapene lav intensitet ved alle lagringstidene fra 21 dager før utløpsdato til 38 dager over utløpsdato. Ved bedømmelse var det 21 dager igjen til utløpsdato for referansepakken.

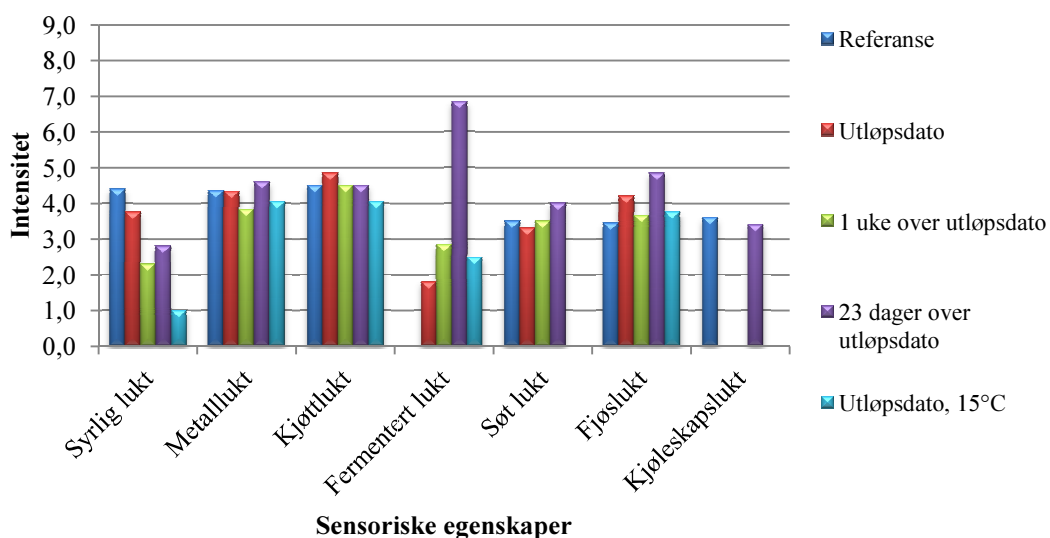
Utover sensoriske forskjeller i referansepakken og utløpsdato for kyllingpålegg, (Figur 4.9) var det relativt stabile intensiteter i egenskapene ved resterende lagringstider. Egenskapen "fjøslukt" ble ikke registrert ved noen av lagringstidene i kyllingpålegg av paneldommerne.

Ved bedømmelse av røkt skinke (Figur 4.10) ble det påvist små forskjeller mellom ulike lagringstider og referansen, som gikk ut på dato 29 dager før bedømmelsen. De sensoriske egenskapene var relativt stabile over tid, med unntak av syrlig lukt og kjøttlukt som ble redusert, og økning av fermentert lukt.

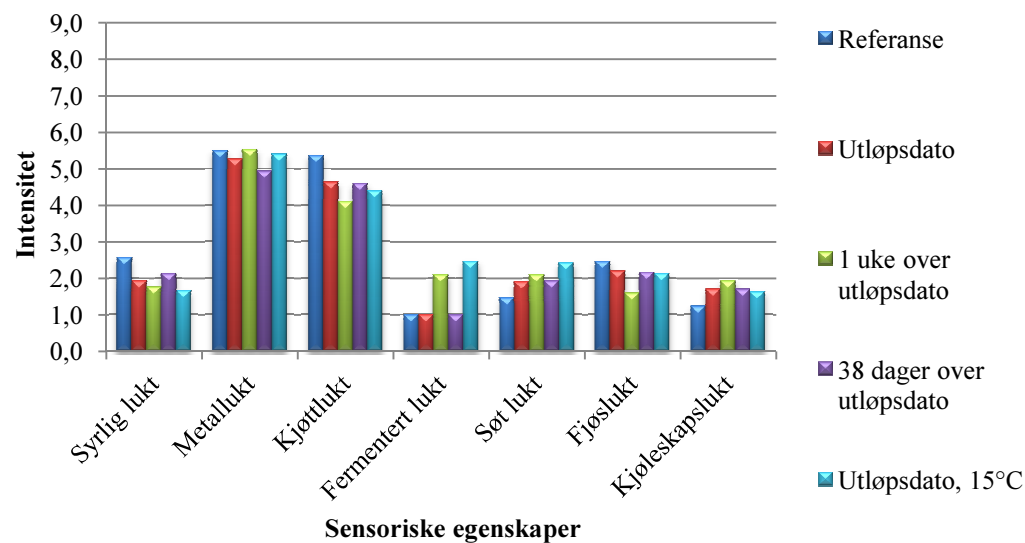
Intensiteten av sensoriske egenskaper på servelat er vist i Figur 4.11. Ved bedømmelse var det 19 dager igjen til utløpsdato for referansepakken. Begge pakkene ved utløpsdato (ulike batch nr.) har noe høyere intensitet av egenskapene syrlig lukt og kjøttlukt enn referansen. Servelat er mer

fermentert ved 14 dager over utløpsdato enn ved 27 dager, hvor fermentert lukt ikke er registrert.

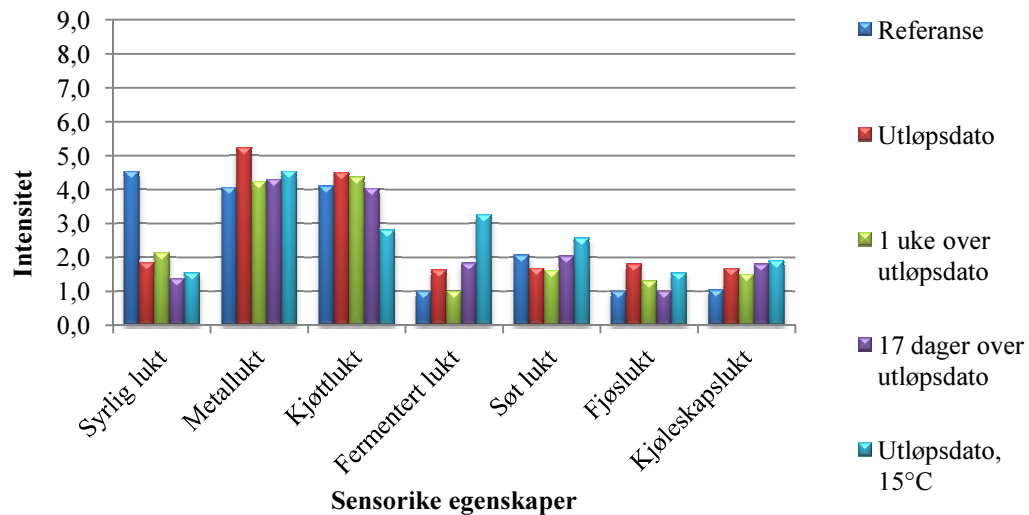
Det var ikke statistisk signifikans ($p>0,05$) mellom høye bakterienivå i pålegg bedømt sensorisk og høy negativ sensorisk score for fermentert lukt, mot lavt bakterienivå og høy positiv sensorisk score av syrlig lukt for pålegg i lagringsforsøk 1 og 2, eller i en samlet test. Det ble heller ikke påvist statistiske forskjeller ($p>0,05$) mellom åpne og lukkede påleggspakker.



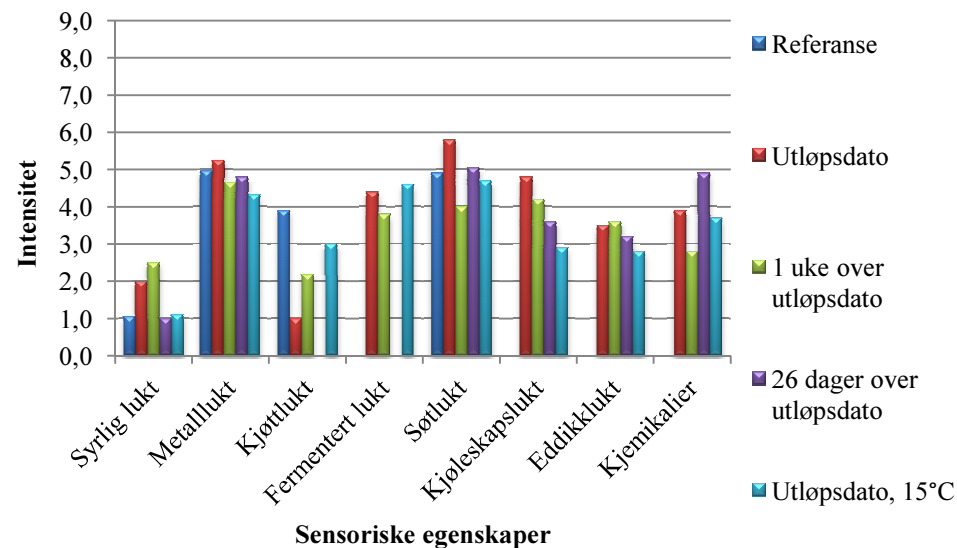
Figur 4.7 Sensorisk bedømmelse av pepperskinke ved ulike lagringstider.



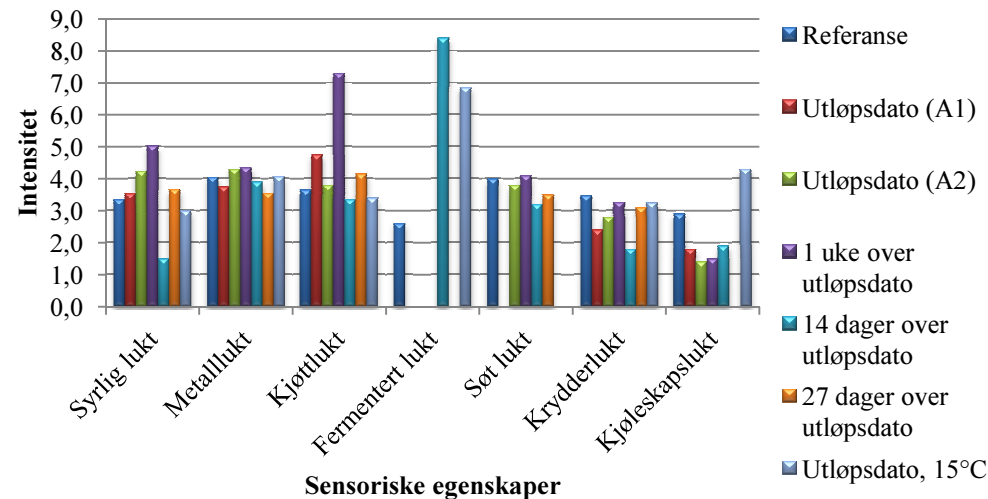
Figur 4.9 Sensorisk bedømmelse av kokt skinke ved ulike lagringstider.



Figur 4.10 Sensorisk bedømmelse av røkt skinke ved ulike lagringstider



Figur 4.8 Sensorisk bedømmelse av kyllingpålegg ved ulike lagringstider.



Figur 4.11 Sensorisk bedømmelse av servelat ved ulike lagringstider.

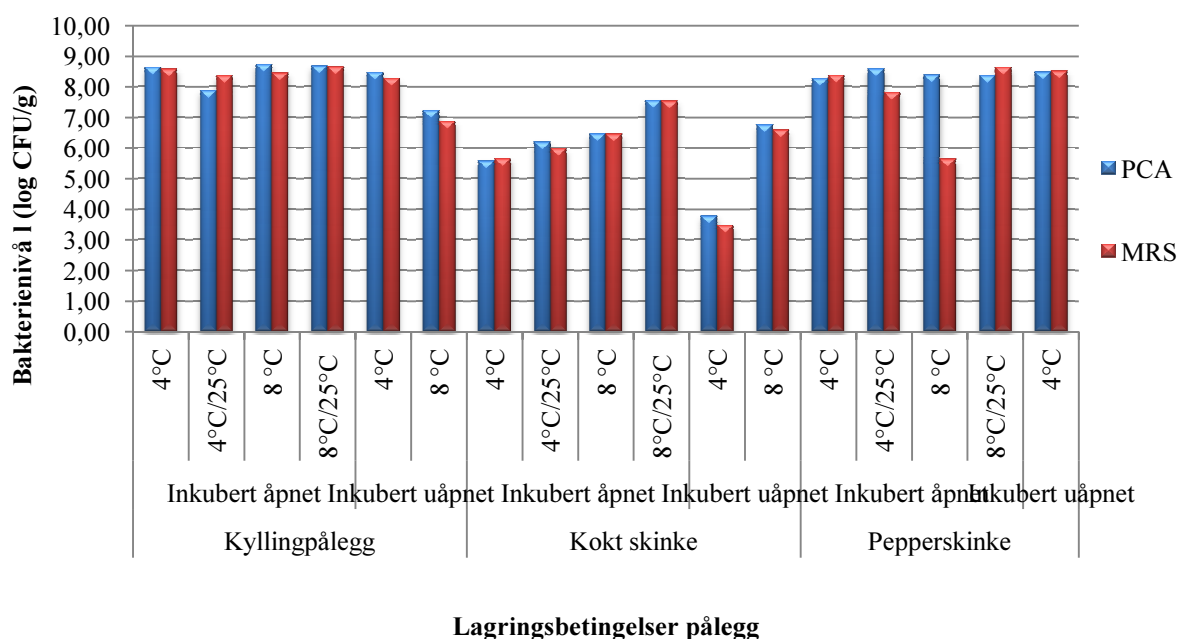
Lagringsforsøk 2

Lagringsbetingelsene i lagringsforsøk 2 ble endret for å tilsvare en realistisk håndtering av produkt hos forbruker. Produktene ble lagret ved 8°C og 4°C, samtidig ble pålegg lagret daglig ved 25°C i to timer. Betingelsene tilsvarer optimal og forhøyet kjøleskapstemperatur, og pålegg liggende i romtemperatur under et måltid. Både åpne og lukkede påleggspakker ble benyttet i lagringsforsøk 2. Detaljert beskrivelse av oppsett er gitt i Materialer og metoder, avsnitt 3.5.2.

4.2.3 Bakterienivå i kjøttpålegg

Bakterienivåer (log CFU/g) for pepperskinke, kokt skinke, og kyllingpålegg ved utløpsdato er gitt i Figur 4.12. Bakterienivået ved utløpsdato ligger relativt jevnt (og høyt) for kyllingpålegg og pepperskinke ved alle lagringsbetingelser, inkludert uåpnet pakning lagret ved 4°C.

Bakterienivået ligger mellom log 8-9 CFU/g uavhengig av lagringsbetingelsene. Det var liten/ingen påvirkning på bakterienivået ved lagring ved 8°C/25°C, sammenlignet med optimal lagring (<4°C). For kokt skinke har lagring ved 8°C/25°C gitt det høyeste bakterienivået, men har generelt lavere bakterienivå enn pepperskinke og kyllingpålegg.



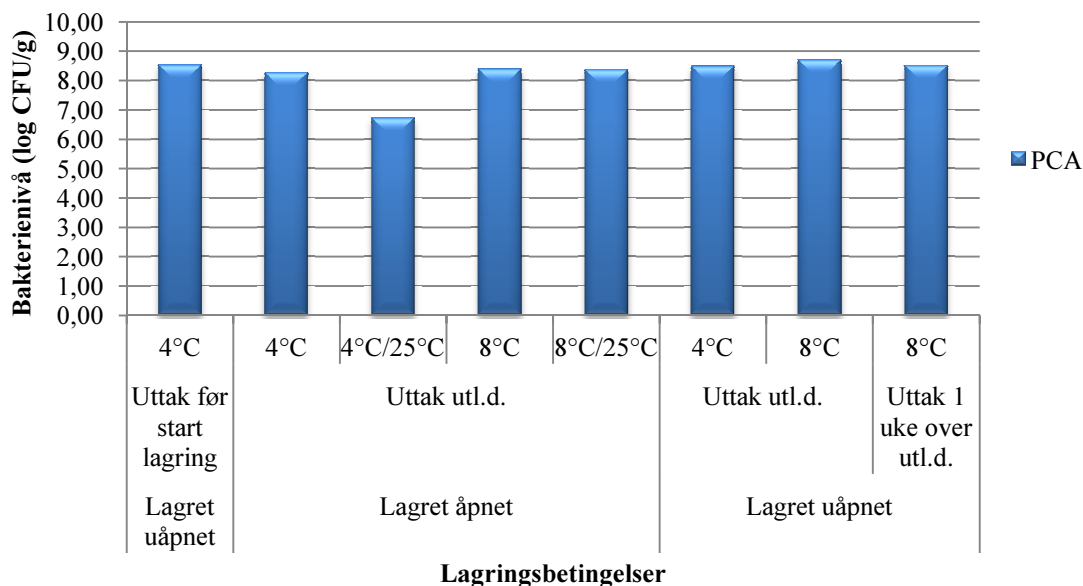
Figur 4.12 Bakterienivå (log CFU/g) for kyllingpålegg, kokt skinke og pepperskinke ved utløpsdato. Prøvene ble inkubert aerobt på PCA og MRS.

Da det ikke var signifikante forskjeller ($p > 0,05$) i bakterienivå mellom aerob og anaerob inkubering i lagringsforsøk 1, ble prøvene i lagringsforsøk 2 inkubert aerobt på MRS og PCA. Det var ikke signifikante forskjeller ($p > 0,05$) i bakterienivå mellom lagring ved 4°C og 8°C eller ved lagring av åpne og uåpnede pakker. Det var heller ikke signifikante forskjeller ($p > 0,05$) i bakterienivå ved utløpsdato og lagring utover utløpsdato og ved inkubering ved 25°C. Dette var

tilfellet for kyllingpålegg og pepperskinke i lagringsforsøk 2. Det ble derimot påvist statistisk signifikans mellom åpnet og uåpnet produkt for kokt skinke ($P=0,01$).

I resten av resultatdelen er resultatene fra PCA inkubert aerobt presentert. Resultatene fra MRS inkubert aerobt er gitt i Vedlegg 2.

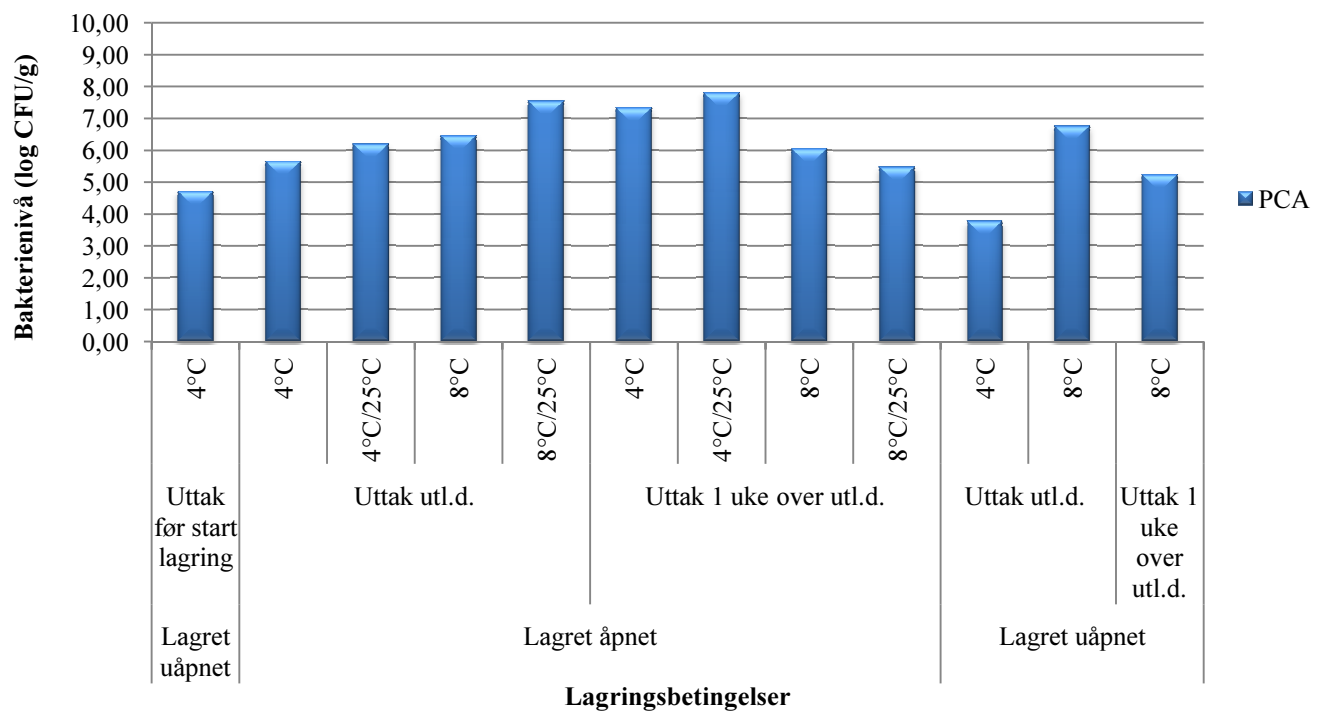
Bakterienivå i pepperskinke ved ulike lagringsforhold er gitt i Figur 4.13. Generelt er bakterienivået ganske høyt, mellom log 8-9 CFU/g, ved alle lagringsbetingelser, både i åpne og uåpnede pakker, med unntak av 4°C/25°C ved utløpsdato i åpnet pakke (log 6,7 CFU/g). I påleggspakken til pepperskinke var det ikke tilstrekkelig antall skiver til uttak 1 uke over utløpsdato for åpne pakker.



Figur 4.13 Bakterienivå (log CFU/g) for pepperskinke ved ulike lagringsbetingelser. Uttak før start lagring ble utført 2 uker før utløpsdato.

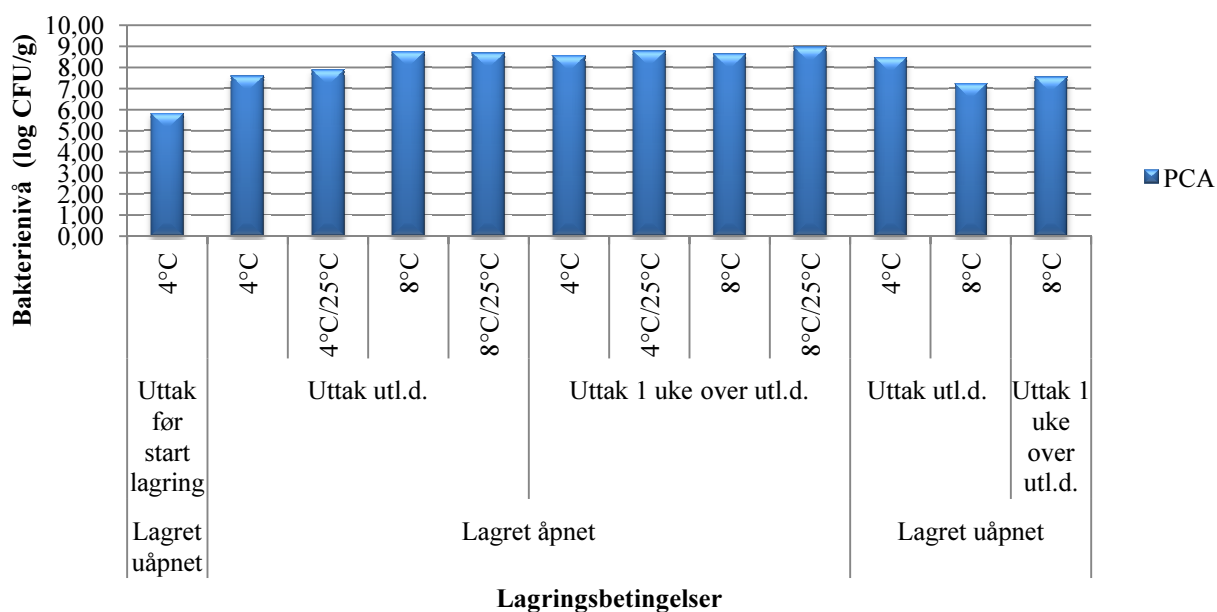
Bakterienivået i kokt skinke ved ulike lagringsforhold er gitt i Figur 4.14. Ved 8°C og 8°C/25°C blir bakterienivået redusert fra utløpsdato til en uke over utløpsdato i åpnet pakke. Ved 4°C og 4°C/25°C er tilfellet motsatt; bakterienivået øker fra utløpsdato til en uke over utløpsdato.

Åpning av pakken fører til høyere bakterienivå, særlig ved lagringsbetingelsene 8°C/25°C ved utløpsdato, og 4°C/25°C 1 uke over utløpsdato.



Figur 4.14 Bakterienivå (log CFU/g) for kokt skinke ved ulike lagringsbetingelser. Uttak før start lagring ble utført 2 uker før utløpsdato.

Bakterienivå ved 8°C og 8/25°C endrer seg lite fra utløpsdato til en uke over utløpsdato for kyllingpålegg (Figur 4.15). Ved 4°C og 4°C/25°C er det en økning på omtrent log 1 CFU/g, fra utløpsdato til 1 uke over utløpsdato. Det var generelt høyt bakterienivå ved de ulike lagringsbetingelsene, både for åpne og uåpne pakker. I uåpnet pakke lagret ved 4°C er det høyere bakterienivå enn i pakken lagret uåpnet ved 8°C.



Figur 4.15 Bakterienivå (log CFU/g) for kyllingpållegg ved ulike lagringsbetingelser. Uttak før start lagring ble utført 2 uker før utløpsdato.

4.2.4 Sensorisk bedømmelse av lagret kjøttpållegg

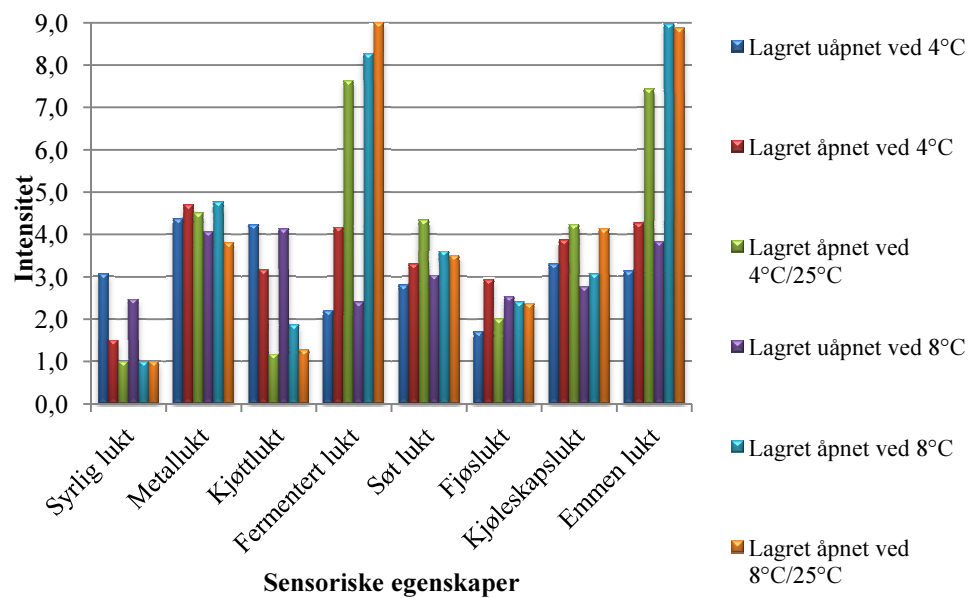
Et tilsvarende sensorisk benkeforsøk som i lagringsforsøk 1, ble utført på pålegg i lagringsforsøk 2. For detaljert beskrivelse av oppsett, se avsnitt 3.6.2.

I Figur 4.16 - Figur 4.18 er det vist intensiteten til sensoriske egenskaper (lukt) for henholdsvis kyllingpållegg, kokt skinke og pepperskinke. Fermentert lukt og emmen lukt er mest fremtredende i åpnet pålegg lagret ved 8°C, og ved 8°C/25°C for alle 3 påleggstypene, og de resterende egenskapene var relativt stabile ved utløpsdato. Åpnede pakker lagret ved 8°C viste tydelig økt intensitet i negative sensoriske egenskaper sammenlignet med uåpnede pakker lagret ved samme temperatur.

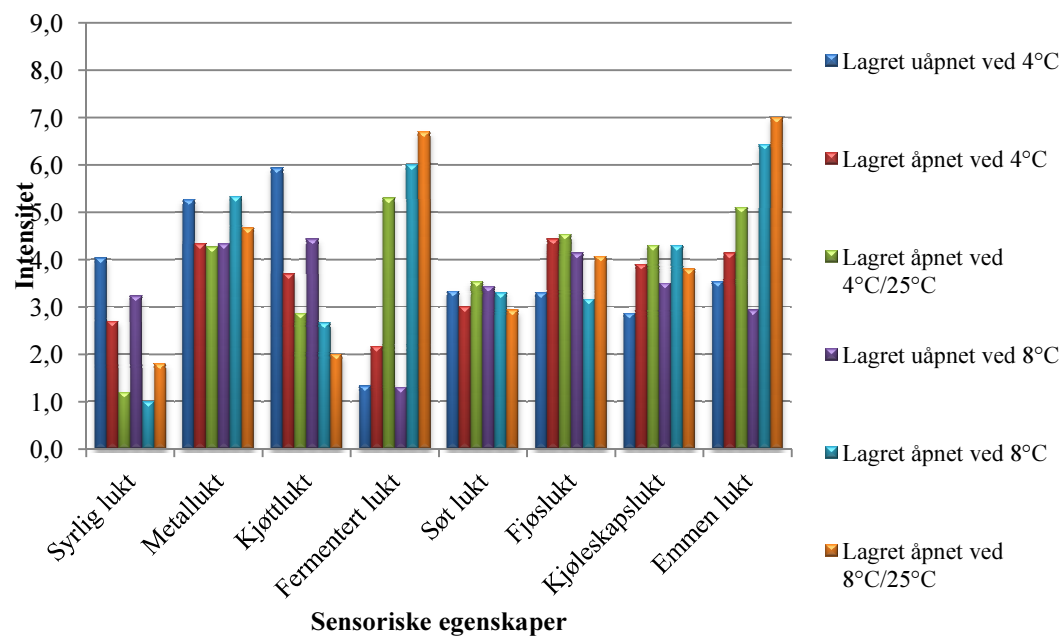
Figur 4.18 viser intensiteten på sensoriske egenskaper i pepperskinke. Pålegget hadde lavest intensitet av fermentert lukt og emmen lukt ved både åpnede og lukkede pakker ved alle lagringstemperaturer, sammenlignet på kokt skinke og kyllingpållegg.

Intensiteten av fermentert lukt og emmen lukt var høy i åpnet pakke lagret ved 8°C for kokt skinke ved utløpsdato (Figur 4.17).

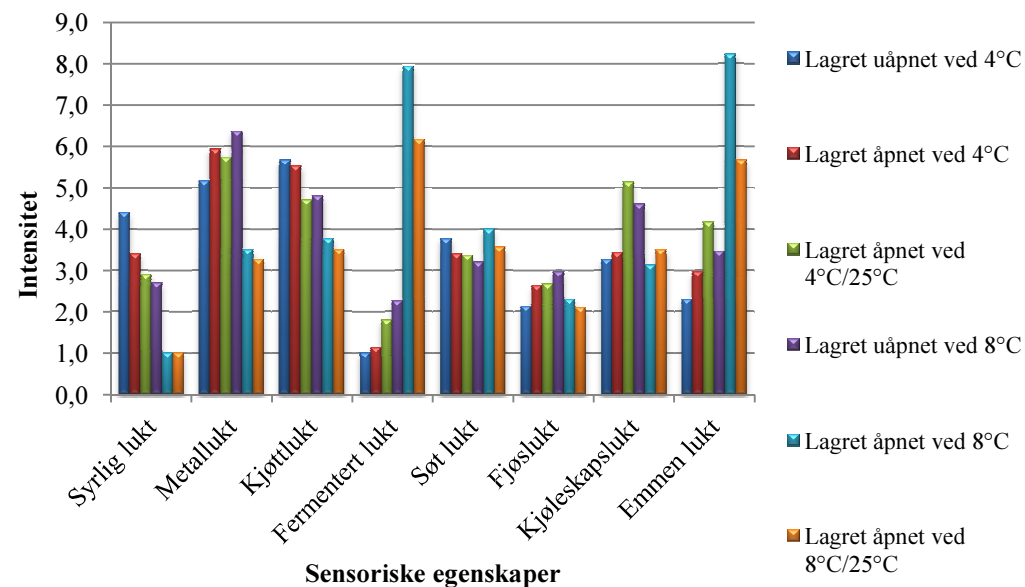
Høye nivå av fermentert lukt og emmen lukt er tilstede i åpnede pakker av kyllingpållegg lagret ved 8°C, ved 8°C/25°C og ved 4°C/25°C (Figur 4.16). Kyllingpållegg har størst forskjeller i grad av intensitet mellom åpnede og lukkede pakker sammenlignet med pepperskinke og kokt skinke.



Figur 4.16 Sensorisk bedømmelse av kyllingspållegg fra lagringsforsøk 2.



Figur 4.18 Sensorisk bedømmelse av pepperskinke fra lagringsforsøk 2.



Figur 4.17 Sensorisk bedømmelse av kokt skinke fra lagringsforsøk 2.

4.3 Identifisering av bakterier

Det ble gjennomført identifisering av bakterier påvist fra overflater i produksjonsanlegg hos produsent 1 og 2, før og under slicing og pakking. Utvalgte bakterier fra kjøttpålegg produsert i disse anleggene ble også identifisert. Opptil 3 kolonier med tilsynelatende lik morfologi ble plukket fra overflater hos produsenter og fra pålegg. Sammensetning av bakterieflora i kjøttpålegg ble bestemt ved dyrkingsuavhengig analyse (Miseq, Illumina). Identifisering av kolonier ble utført på grunnlag av 16s rDNA-sekvensering. Detaljert beskrivelse av oppsett og valg av kolonier til identifisering er gitt i avsnitt 3.8.1.

4.3.1 Identifisering av bakterier fra produksjonsmiljø

Som tidligere nevnt i avsnitt 4.1, ble det påvist få bakterier fra produktkontakflater før produksjonsstart. I Tabell 4.4. er det listet opp bakterier påvist hos produsent 1 og 2, før og under produksjon av kjøttpålegg. Fra produsent 1 ble det påvist 4 bakterier før produksjonsstart; *Lactobacillus* (n=2), *Staphylococcus* (n=1) og *Pseudomonas* (n=1). To kolonier med lik morfologi ble identifisert som *Lactobacillus*, og koloniene fra gulv/undersiden av linjen var morfologisk like, men ble identifisert som ulike bakterier, *Staphylococcus* og *Pseudomonas*. *Staphylococcus* (n=2) ble funnet på gulvet både før og under produksjon av pepperskinke. *Pseudomonas* (n=2) ble også funnet på gulvet før produksjonsstart, og på sprettekniv under produksjon av pepperskinke. *Lactobacillus* (n=2) var tilstede på blå og hvite strikker (transportbånd) før produksjonsstart.

Under produksjon av pepperskinke ble det identifisert totalt 15 bakterieisolater (Tabell 4.4), og *Carnobacterium* dominerte i produksjonsmiljøet. Koloniene på sprettekniv hadde lik morfologi, men ble identifisert som *Carnobacterium* (n=2) og *Pseudomonas* (n=1). På skjæreblad og påleggsavlaster ble kolonier med ulik morfologi identifisert som *Carnobacterium* (n=8). Det ble også identifisert kolonier med lik morfologi som *Leuconostoc* (n=3) på påleggsavlaster.

Sikkerheten på identifisering av koloniene fra produsent 1 var >96% sekvenslikhet for alle koloniene, med unntak av *Pseudomonas* påvist på sprettekniv (62% sekvenslikhet) og *Staphylococcus* påvist på gulv/undersiden av produksjonslinjen (76%) under produksjon av pepperskinke.

Hos produsent 2 ble det påvist flere bakterier før produksjonsstart, særlig av linjen hvor kokt skinke ble slicet og pakket (linje K). Fra denne linjen ble det identifisert totalt 15 bakterieisolater. *Serratia* dominerer ved produksjonslinje K før produksjonsstart. På transportbånd ble det påvist *Serratia* (n=5) som ble beskrevet med ulike morfologier. *Serratia* ble også påvist på metallvalsen (n=1). På skumvalsen ble det påvist *Pseudomonas* (n=1), *Brevibacterium* (n=1), *Lactobacillus* (n=1),

Carnobacterium (n=1) og *Jeotgalicoccus* (n=1). På skjæreblad ble det påvist *Enterococcus* (n=1), og kolonier med lik morfologi identifisert som *Raoultella* (n=2). På røde og gule strikker (transportbånd) ble det påvist *Lactobacillus* (n=1).

Koloniene fra linje K (kokt skinke) ble identifisert med sikkerhet på >97% sekvenslikhet for alle koloniene med unntak av 2 *Serratia* påvist på henholdsvis metallvalsen og transportbåndet med sikkerhet på 53% og 82% sekvenslikhet påvist før produksjonsstart.

Fra linje F (kyllingpålegg) ble det identifisert 2 kolonier fra oppsamlingsbordet før produksjonsstart, med ulik morfologi. Begge ble identifisert som *Pseudomonas* med 98% og 73% sekvenslikhet.

Tabell 4.4 Identifiserte kolonier påvist før og under produksjon av kjøttpålegg hos produsent 1 og 2.

	Produsent 1				Produsent 2	
	Miljø ¹		Kontaktflater ²		Miljø ¹	Kontaktflater ²
Bakterieslekt	Før prod. ³ (n=2)	Under prod. ⁴ (n=1)	Før prod. ³ (n=2)	Under prod. ⁴ (n=14)	Før prod. ³ (n=6)	Før prod. ³ (n=11)
<i>Carnobacterium</i>				X (P)	X (Ko)	
<i>Serratia</i>					X (Ko)	X (Ko)
<i>Leuconostoc</i>				X (P)		
<i>Lactobacillus</i>			X		X (Ko)	X (Ko)
<i>Staphylococcus</i>	X	X (P)				
<i>Enterococcus</i>						X (Ko)
<i>Raoultella</i>						X (Ko)
<i>Brevibacterium</i>					X (Ko)	
<i>Jeotgalicoccus</i>					X (Ko)	
<i>Pseudomonas</i>	X			X (P)	X (Ko)	X (Ky)

1 Prøvepunkter ved produksjonslinjen som ikke er i direkte kontakt med produktet

2 Prøvepunkter ved produksjonslinjen som er i direkte kontakt med produktet

3 Prøvepunkter tatt før produksjonsstart

4 Prøvepunkter tatt under produksjon. Bokstavene i parentes refererer til påleggstypen som ble produsert ved prøvetaking.
P:pepperskinke, Ko:kokt skinke, Ky: kyllingpålegg.

4.3.2 Identifisering av bakterier i kjøttpålegg

Identifisering av utvalgte kolonier og bakterieflora i pålegg fra lagringsforsøkene ble utført ved delvis sekvensering av 16S-rRNA-genet og ved dyrkingsuavhengig analyse (Miseq, Illumina). Koloniene ble plukket hovedsakelig fra pålegg platet ut ved utløpsdato inkubert aerobt på PCA.

4.3.2.1 Identifisering av kolonier ved 16S-rDNA

Påviste kolonier fra pålegg i lagringsforsøk 1 (uåpnede pakker lagret ved 4°C) er gitt i Tabell 4.5. Kolonier fra pepperskinke, røkt skinke og kyllingpålegg er plukket ved utløpsdato. Kolonier identifisert fra kokt skinke og servelat er fra et senere tidspunkt, da de var under deteksjonsgrensen ($<\log 5$ CFU/g.) ved utløpsdato. Koloni fra kokt skinke er plukket ved 1 uke over utløpsdato, mens for servelat er koloniene fra 17 og 27 dager over utløpsdato. Det ble hovedsakelig valgt kolonier fra PCA inkubert aerobt, men unike kolonier fra MRS inkubert aerobt ble også valgt til sekvensering. Totalt 48 kolonier ble identifisert fra lagringsforsøk 1.

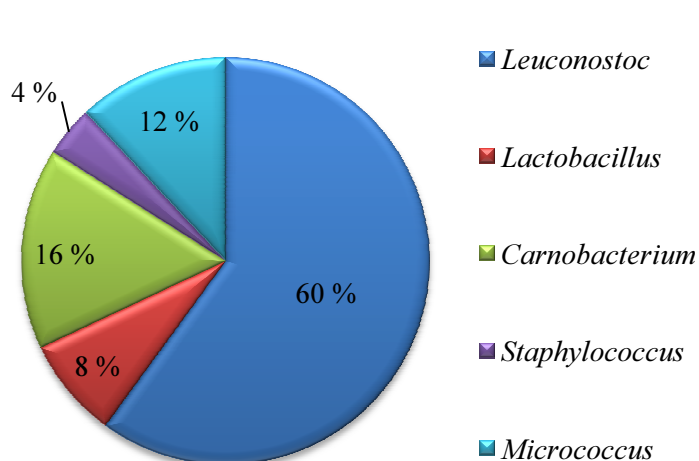
Basert på plukkede kolonier ble det påvist størst mangfold i røkt skinke, og flest kolonier påvist sammenlignet med de andre påleggstypene. For kokt kokt skinke var bakterienivået lavt ved 1 uke over utløpsdato, og kun 1 koloni ble dyrket opp og identifisert. *Leuconostoc* og *Lactobacillus* er tilstede i alle påleggstypene, med unntak av kokt skinke. Det ble også identifisering kolonier ved utløpsdato for hel pepperskinke fra PCA inkubert aerobt. Alle kolonier fra overflate ble påvist som *Pseudomonas* (n=29). *Pseudomonas* ble ikke påvist i de andre påleggstypene, heller ikke i skivet pepperskinke.

Tabell 4.5 Påviste bakterieslekter fra ulike pålegg i lagringsforsøk 1.

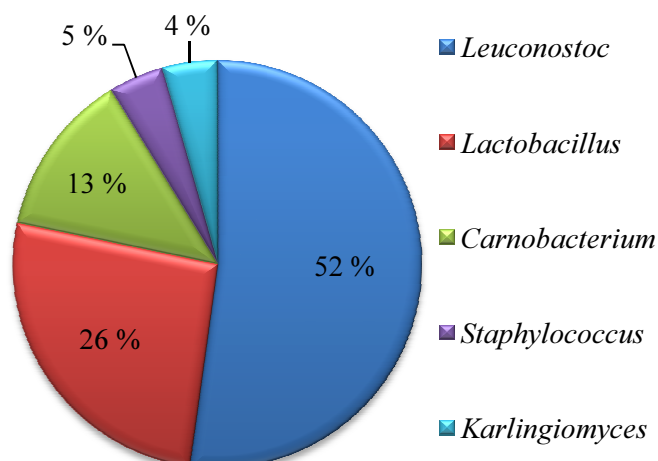
Bakterieslekt	Pepperskinke ¹ (n=14)	Røkt skinke ¹ (n=16)	Kokt skinke ² (n=1)	Kyllingpålegg ¹ (n=9)	Servelat ³ (n=3)	Servelat ⁴ (n=5)
<i>Leuconostoc</i>	X (n=11)	X (n=6)		X (n=5)	X (n=2)	X (n=3)
<i>Carnobacterium</i>		X (n=6)				X (n=1)
<i>Lactobacillus</i>	X (n=2)	X (n=3)		X (n=2)	X (n=1)	
<i>Staphylococcus</i>				X (n=1)		X (n=1)
<i>Micrococcus</i>	X (n=1)	X (n=1)	X (n=1)			
<i>Karlingiomyces</i> *				X (n=1)		

¹ Utløpsdato, ² 1 uke over utløpsdato, ³ 14 dager over utløpsdato, ⁴ 27 dager over utløpsdato, *muggsopp

I Figur 4.19 og Figur 4.20 er påviste bakterieslekter fra pålegg i lagringsforsøk 1 fordelt på næringsmediene de ble plukket fra, henholdsvis PCA og MRS. Totalt 25 kolonier ble plukket fra PCA, mens 23 kolonier ble plukket fra MRS. Andel påviste *Leuconostoc*, *Carnobacterium* og *Staphylococcus* er relativt like ved begge næringsmediene. *Leuconostoc* dominerte ved både PCA og MRS. En større andel *Lactobacillus* er påvist på MRS i forhold til på PCA. Det ble påvist de samme bakterieslektene på begge mediene, med unntak av *Micrococcus* på PCA og *Karlingomyces* (muggsopp) på MRS.



Figur 4.19 Påviste bakterieisolater fra lagringsforsøk 1. Isolatene er plukket fra PCA inkubert aerobt (n=25).



Figur 4.20 Påviste bakterieisolater fra lagringsforsøk 1. Isolatene er plukket fra MRS inkubert aerobt (n=23).

Lagringsforsøk 2 var mer omfattende enn lagringsforsøk 1, og flere kolonier ble identifisert fra lagringsforsøk 2 (pepperskinke, kokt skinke og kyllingpålegg). For detaljert beskrivelse av oppsett og utførelse, se Materialer og metoder, avsnitt 3.5.2. Det ble identifisert 47 bakterieisolater fra pepperskinke, 41 fra kokt skinke og 38 fra kyllingpålegg. Totalt 127 kolonier ble identifisert fra pålegg i lagringsforsøk 2.

Leuconostoc og *Pseudomonas* er påvist i alle påleggstypene (Tabell 4.6). *Leuconostoc* var tilstede i åpne og lukkede pakker, mens *Pseudomonas* var påvist i åpne pakker. En relativt stor andel *Carnobacterium* var tilstede i kokt skinke og kyllingpålegg, men ikke påvist i pepperskinke. Derimot ble det påvist *Lactobacillus* i pepperskinke, men ikke i de andre påleggstypene. Pepperskinke har størst diversitet med 7 ulike bakterieslekter påvist. I kyllingpålegg ble det påvist 5 ulike

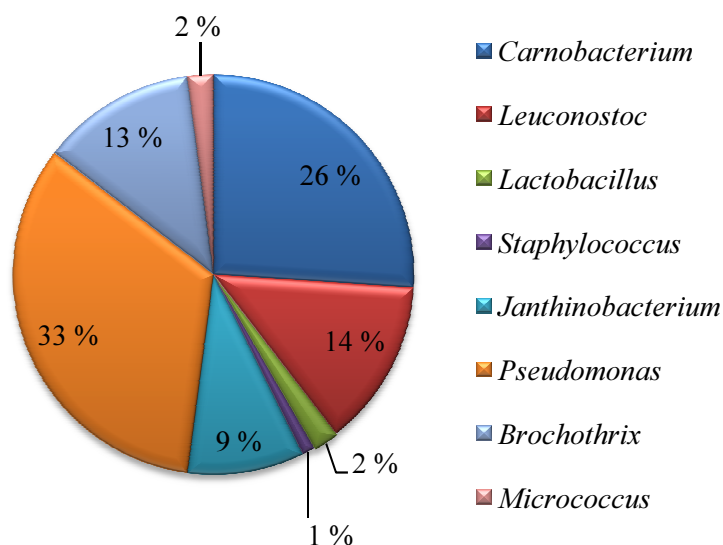
bakterieslekter, mens 4 ulike bakterieslekter ble påvist i kokt skinke. Flertallet av *Brochothrix* ble påvist i kyllingpålegg, men ble også identifisert fra pepperskinke. For pepperskinke er det lavere diversitet i åpnet pakke lagret ved 4°C sammenlignet med åpnet pakke lagret ved 4°C /25°C. For kokt skinke er tilfellet omvendt; åpnet pakke lagret ved 4°C / 25°C viste størst diversitet. I kyllingpålegg er det påvist *Pseudomonas*, *Leuconostoc* og *Brochothrix* ved åpnet pakke lagret 4°C. De to sistnevnte slektene er også påvist ved 4°C /25°C, i tillegg til *Carnobacterium*. I uåpnede pakker av kokt skinke, ble det påvist *Carnobacterium* ved både 4°C og 8°C som eneste identifiserte bakterieslekt.

Statistisk sammenheng mellom dominerende slekter i åpnet og uåpnet produkt ble testet med Fishers eksakt test. Det var ikke statistisk forskjell ($p>0.05$) om slektene *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Brochothrix*, eller *Pseudomonas* dominerte i lukkede eller åpnede påleggspakker. Prosentvis fordeling av *Leuconostoc* var høyere ($p<0.05$) i uåpnede enn i åpnede pakker.

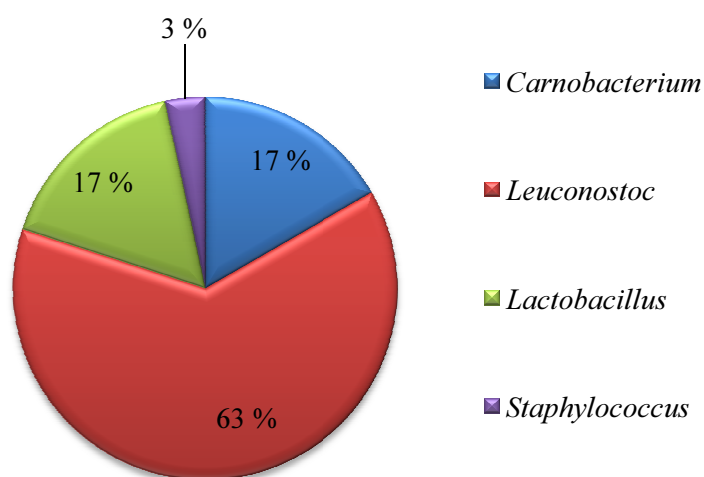
Tabell 4.6 Identifiserte isolater fra pålegg i lagringsforsøk 2. er fra pålegg lagret åpnet og uåpnet ved utløpsdato ved angitte lagringstemperaturer. I parentes er det oppgitt antall bakterier identifisert av hver slekt. Totalt antall bakterier identifisert er oppført etter hver påleggstype.

Bakterieslekt	Pepperskinke (n=46)			Kokt skinke (n= 43)			Kyllingpålegg (n=38)			
	Lagret	Lagret	Lagret	Lagret	Lagret	Lagret	Lagret	Lagret	Lagret	Lagret
	åpnet ved 4°C	åpnet ved 4°C/25°C	uåpnet ved 4°C	åpnet ved 4°C	åpnet ved 4°C/25°C	uåpnet ved 4°C	uåpnet ved 8°C	åpnet ved 4°C	åpnet ved 4°C/25°C	uåpnet ved 4°C
<i>Carnobacterium</i>				X (8)	X (6)	X (5)	X (1)		X (7)	X (3)
<i>Lactobacillus</i>	X (3)	X (4)								
<i>Leuconostoc</i>	X (4)		X (4)	X(3)	X (7)			X (6)	X (3)	X (5)
<i>Pseudomonas</i>	X (19)	X (1)		X(4)	X (8)			X (1)	X (1)	
<i>Brochothrix</i>			X (1)					X (3)	X (6)	X (2)
<i>Janthinobacterium</i>	X (7)				X (1)					
<i>Staphylococcus</i>			X (1)							X (1)
<i>Micrococcus</i>	X (2)									

I Figur 4.21 og Figur 4.22 er påviste bakterieslekter fra pepperskinke, kokt skinke og kyllingpållegg fordelt på næringsmediene de ble plukket fra. Totalt ble det plukket 96 kolonier fra PCA, og 31 fra MRS. Fra PCA ble det identifisert 8 ulike bakterieslekter, mens for MRS ble 4 ulike bakterieslekter påvist. På PCA dominerte *Pseudomonas*, og på MRS dominerte *Leuconostoc*. De fire bakterieslektene påvist på MRS, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* og *Staphylococcus*, er også påvist på PCA. I tillegg er det påvist bakterieslektene *Janthinobacterium*, *Pseudomonas*, *Brochothrix* og *Micrococcus* på PCA.



Figur 4.21 Identifiserte bakterieisolater fra lagringsforsøk 2. Isolatene er plukket fra PCA inkubert aerobt (n=96).



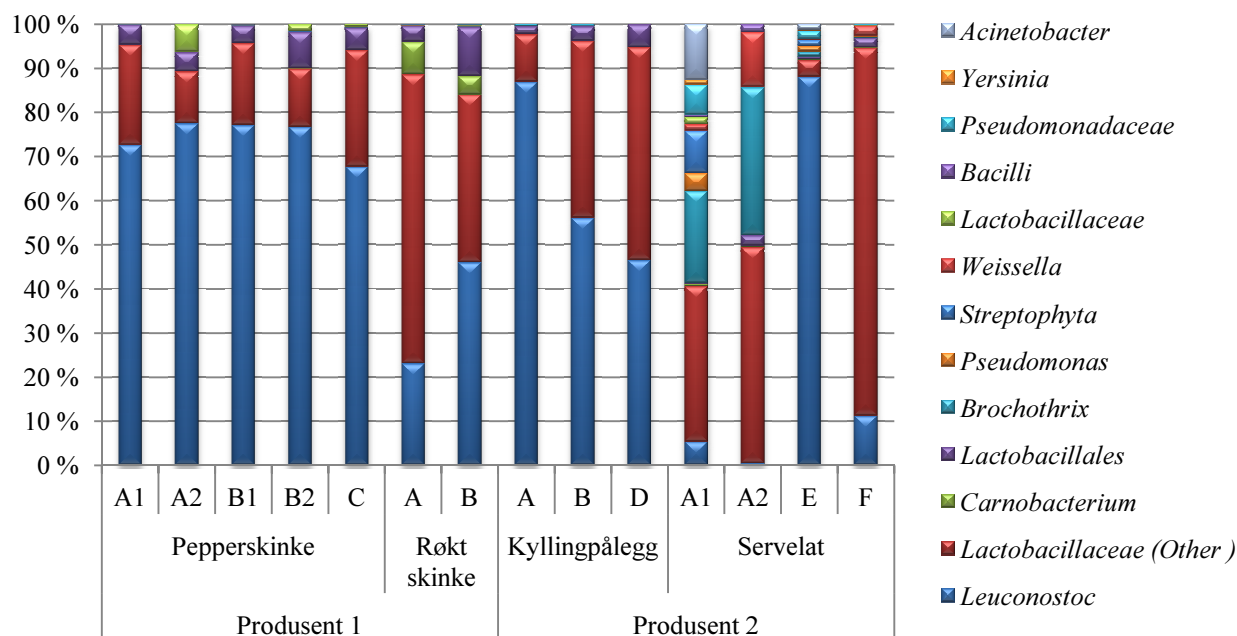
Figur 4.22 Identifiserte bakterieisolater fra lagringsforsøk 2. Isolatene er plukket fra MRS inkubert aerobt (n=31).

4.3.2.2 Identifisering av bakterieflora ved dyrkingsuavhengige analyser

Identifisering av bakterieflora ble gjennomført ved bruk av dyrkingsuavhengige analyser (16S rDNA sekvensering ved bruk av Miseq) på påleggsprøver fra lagringsforsøk 1 og 2. Det ble ikke oppnådd data for kokt skinke på grunn av lavt celletall i prøvene. Figur 4.23 presenterer de mest dominerende bakteriene i prøvene (andel >1% av totaltallet) fra pålegg i lagringsforsøk 1.

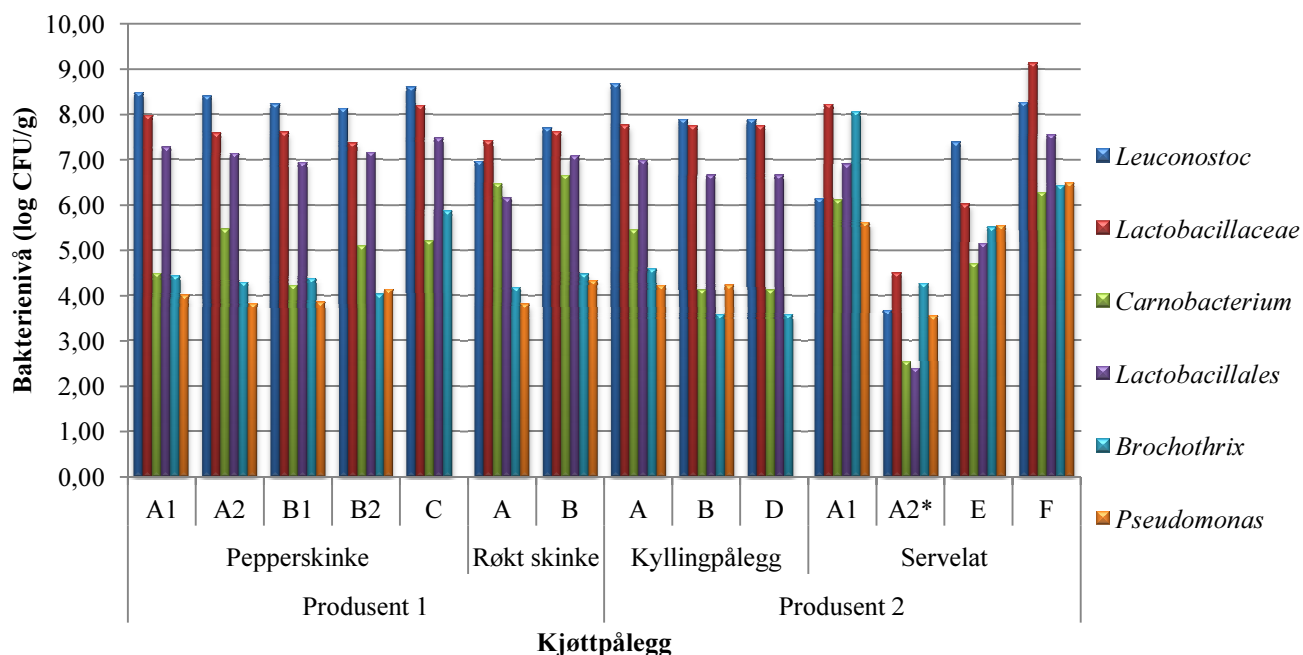
Figur 4.23 viser at bakteriefloraen i pepperskinke var dominert av *Leuconostoc* både ved utløpsdato (A1, A2), 7 (B1, B2) og 23 dager (C) over utløpsdato, og nivået holder seg relativt stabilt over tid. Resterende bakterieflora er identifisert som familien *Lactobacillaceae* og ordenen *Lactobacillales*. Familien *Lactobacillaceae* dominerer bakteriefloraen i røkt skinke og blir redusert 1 uke over utløpsdato (B). Samtidig øker andelen *Leuconostoc* fra utløpsdato (A) til 1 uke over utløpsdato (B). En liten andel *Carnobacterium* og ordenen *Lactobacillales* er også tilstede i røkt skinke ved begge lagringstidene, men i noe ulikt forhold. Kyllingpållegg viste

nedgang over tid av *Leuconostoc*, og en økning av *Lactobacillaceae*. Bakterief floraen i servelat viser stor diversitet, særlig ved utløpsdato (A1). I begge pakkene ved utløpsdato og ved 2 uker over utløpsdato dominerer *Lactobacillaceae*, mens *Leuconostoc* dominerer ved 27 dager (E) over utløpsdato.



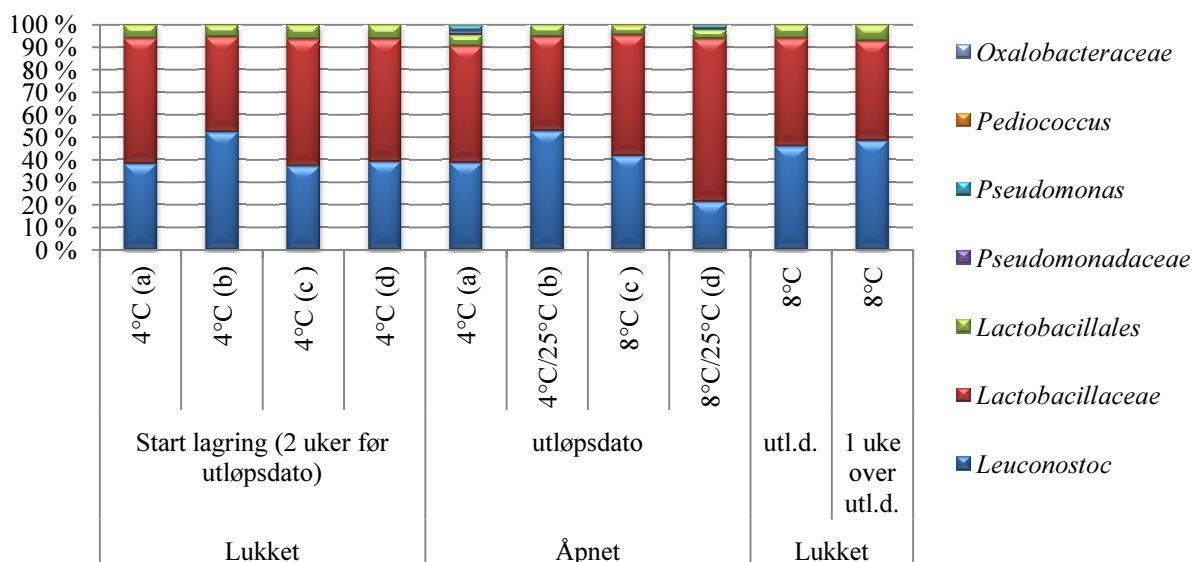
Figur 4.23 Bakterief flora i pålegg fra lagringsforsøk 1. Bokstavene refererer til lagringstid. (A: utløpsdato, B: 1 uke over utløpsdato, C: 23 dager over utløpsdato, D: 26 dager over utløpsdato, E: 27 dager over utløpsdato, F: 14 dager over utløpsdato. 1 og 2 er fra ulike batch-nummer).

Figur 4.24 viser antall av ulike bakterier i pålegg fra lagringsforsøk 1. For pepperskinke, røkt skinke og kyllingpålegg dominerer *Leuconostoc*, og resterende bakterieslekter er relativt stabile over tid for samtlige påleggstyper. Nivå av bakterieslektene endrer seg lite over tid. For servelat ved utløpsdato (A1) dominerer *Brochothrix* og *Lactobacillaceae*. Det er relativt stor forskjell mellom bakterienivå i servelat-pakkene ved utløpsdato.



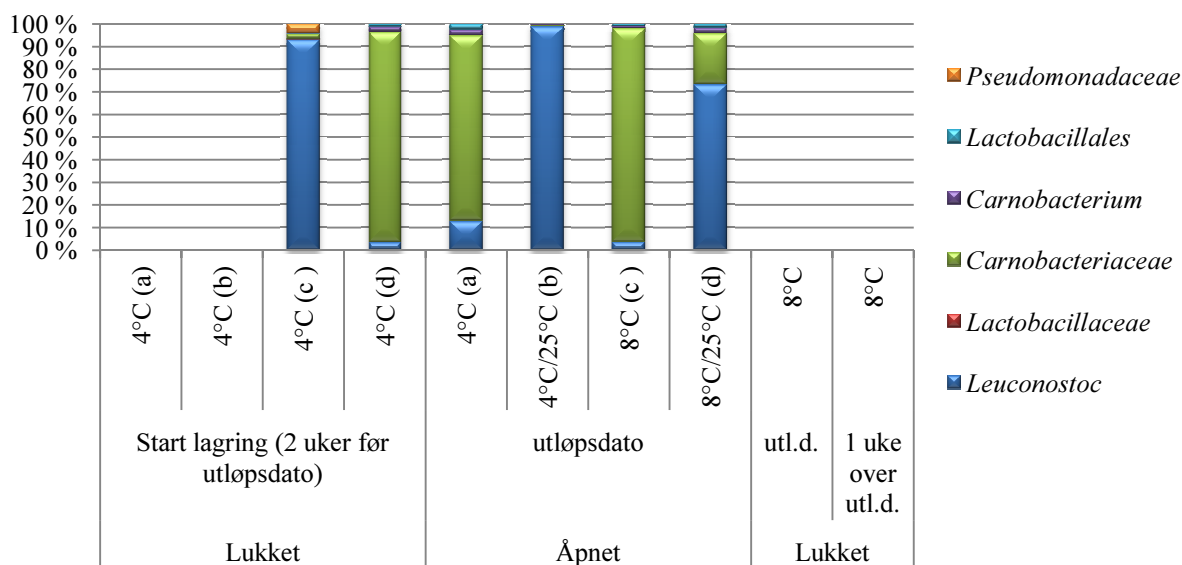
Figur 4.24 Antall av ulike bakterieslekter i påleggstypene ved ulike lagringstider. Bokstavene refererer til lagringstid. A: utløpsdato, B: 1 uke over utløpsdato, C: 23 dager over utløpsdato, D: 26 dager over utløpsdato, E: 27 dager over utløpsdato, F: 14 dager over utløpsdato. Tallene viser til produkter av samme påleggstype som er fra ulike batch-nummer. *: Laveste deteksjonsnivå ($1,00 \cdot 10^5$ CFU/g.) ble benyttet i utregningene. Antallet er beregnet på grunnlag av bestemt totaltall i prøvene og andel av de ulike bakterieslektene påvist etter dyrkningsuavhengig analyser.

Bakteriesammensetning i pepperskinke fra lagringsforsøk 2, viste at det var relativt liten bakteriediversitet med enkelte dominerende slekter ved samtlige lagringsbetingelser (Figur 4.25). *Leuconostoc* og *Lactobacillaceae* varierer med å dominere ved ulike lagringsforhold. En mindre andel *Lactobacillales* er også tilstede ved alle lagringsforhold. Prøvene a, b, c og d lagret lukket ved 4°C, representerer 4 ulike påleggspakker. Pakke b skiller seg ut ved høyere nivå av *Leuconostoc*, og lavere nivå av *Lactobacillaceae*, i forhold til de andre påleggspakkene lagret under samme lagringsbetingelser. Det er forskjeller i bakterieflora i pålegg fra samme batch-nummer lagret under samme forhold.



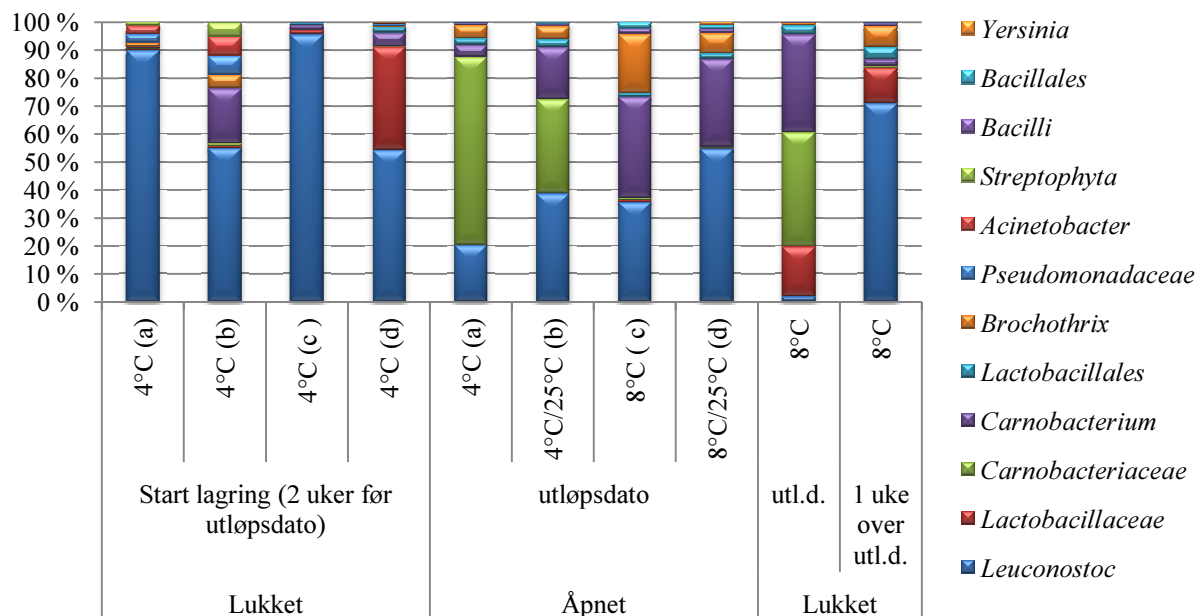
Figur 4.25 Bakterief flora i pepperskinke ved ulike lagringsbetingelser. Dyrkningsuavhengige analyser ble utført på fire påleggspakker (a, b, c og d) med samme batch-nr. Bokstavene i parentes presenterer den gitte påleggspakken ved ulike uttakstider.

I flere av lagringsbetingelsene hos kokt skinke var bakterienivået under deteksjonsgrensen (Figur 4.26). Det var liten diversitet og få slekter med forekomst over 1%. *Leuconostoc* og *Carnobacteriaceae* dominerer ved ulike lagringsbetingelser, men det kommer ikke tydelig fram hvilke lagringsforhold som er optimale for dominans. Pakke a og b lagret lukket ved 4°C var under deteksjonsgrensen, mens i pakkene c og d har høye nivå av henholdsvis *Leuconostoc* og *Carnobacteriaceae*.



Figur 4.26 Bakterief flora i kokt skinke ved ulike lagringsbetingelser. Dyrkningsuavhengige analyser ble utført på fire påleggspakker (a, b, c, d) med samme batch-nr. Bokstavene i parentes presenterer den gitte påleggspakken ved ulike uttakstider.

Kyllingpålegg viser stor diversitet ved samtlige lagringsforhold (Figur 4.27). Som i tilfellene ved pepperskinke og kokt skinke, er det også ulikheter i bakterieflora i pakker fra samme batch-nummer lagret under like forhold. *Leuconostoc* er tilstede ved alle lagringsforhold, med unntak av påleggspakken lagret lukket ved 8°C ved utløpsdato.



Figur 4.27 Bakterieflora i kyllingpålegg ved ulike lagringsbetingelser. Dyrkningsuavhengige analyser ble utført på fire påleggspakker (a, b, c, d) med samme batch-nr. Bokstavene i parentes presenterer den gitte påleggspakken ved ulike uttakstider.

4.4 DNA fingerprinting av isolater

Fingerprinting (typing) av utvalgte isolater ble utført ved hjelp av to PCR-baserte metoder, som beskrevet i Materialer og metoder, avsnitt 3.11. Hensikten med typingen var å få mer kjennskap til diversiteten i bakteriene isolert fra pålegg og fra overflater hos produsent 1 og 2. Sekvensering av 16S-rDNA ga informasjon om bakteriene på slektsnivå, og typingen ga ytterligere informasjon om diversiteten innen hver slekt på stammenivå. Slektene *Leuconostoc*, *Pseudomonas* og *Lactobacillus* ble påvist både på ulike påleggstyper og i produksjonsanlegg, og ble derfor valgt til typing. Figur 4.30 og Figur 4.29 viser typing av de nevnte slektene utført med RAPD-PCR, mens typing utført med rep-PCR er gitt i Figur 4.30 og Figur 4.31.

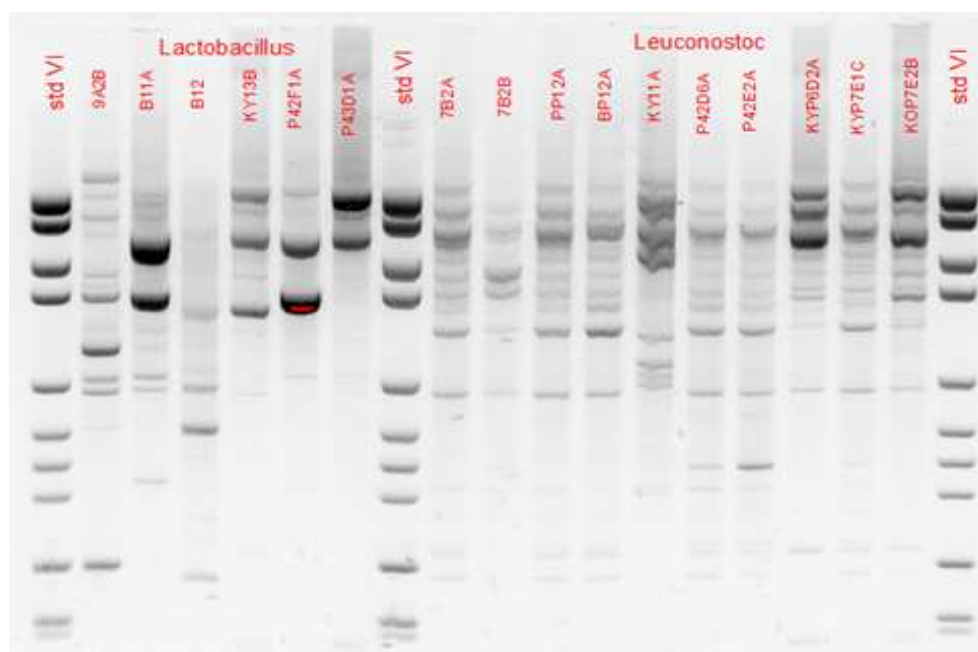
Resultatene viste at de ulike PCR-metodene ga ulik diskriminering av *Lactobacillus* og *Pseudomonas*, med 6 og 5 ulike typingsprofiler for *Lactobacillus* fra henholdsvis rep-PCR og RAPD-PCR. For *Pseudomonas* viste rep-PCR 9 ulike typingsprofiler, sammenlignet med RAPD-PCR som viste 8 ulike typingsprofiler. For *Leuconostoc* viste både rep-PCR og RAPD-PCR 4 ulike profiler. Det ble påvist ulike profiler ved begge metodene, men også like profiler for

isolater fra samme slekt som var fra ulike typer pålegg. Oppsummerte resultater, samt identifisering ved 16S rDNA og kilden isolatene er plukket fra er gitt i Tabell 4.7.

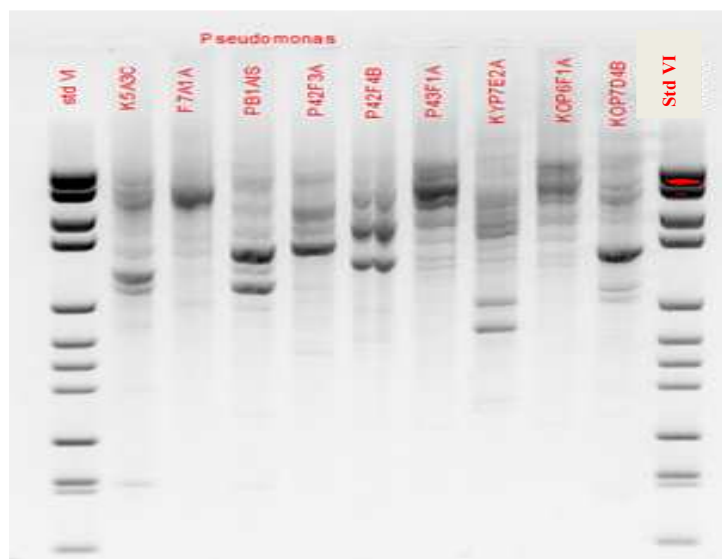
Lactobacillus fra kyllingpålegg og fra pepperskinke viste lik profil fra RAPD-PCR (RAPD 4). Dette er pålegg som er produsert fra ulike produsenter. Typing av *Leuconostoc* ved hjelp av RAPD-PCR viste at seks isolater (påleggsavlaster under produksjon av pepperskinke, pepperskinke, røkt skinke, kokt skinke, og to isolater fra kyllingpålegg) hadde lik profil, RAPD-profil nr. 6. Samtidig ble to andre isolater *Leuconostoc* fra pepperskinke diskriminert som like profiler, RAPD-profil nr. 9. Rep-PCR viste også at seks ulike isolater *Leuconostoc* ga samme profil, delvis de samme isolatene med lik profil fra RAPD-PCR; begge isolatene fra påleggsavlaster under produksjon av pepperskinke, tre isolater fra pepperskinke og ett isolat fra røkt skinke (rep-profil nr. 7).

To andre isolater, en fra kyllingpålegg og en fra kokt skinke, viste samme profil av *Leuconostoc* (rep-profil nr. 9).

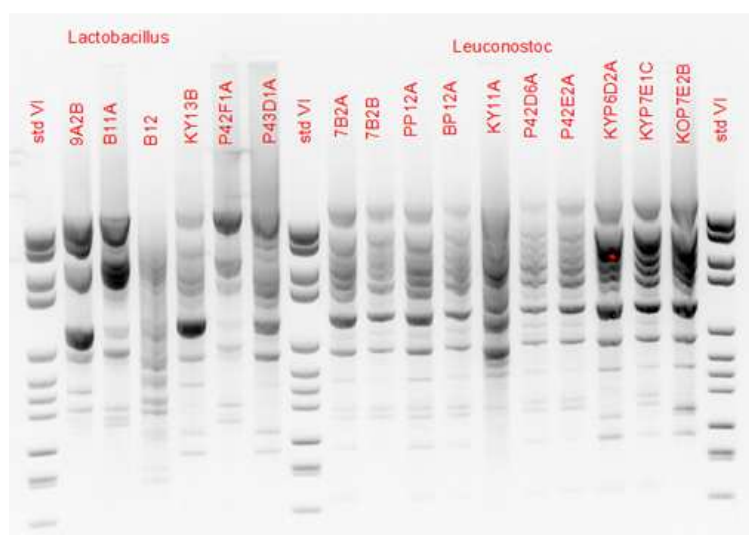
Pseudomonas var den slekten som viste mest variasjon på stammenivå, og dermed flest ulike profiler. To isolater *Pseudomonas* (pepperskinke og kokt skinke) ga samme profil ved hjelp av RAPD-PCR (RAPD15), mens rep-PCR viste at alle isolatene identifisert som *Pseudomonas* ga ulike profiler.



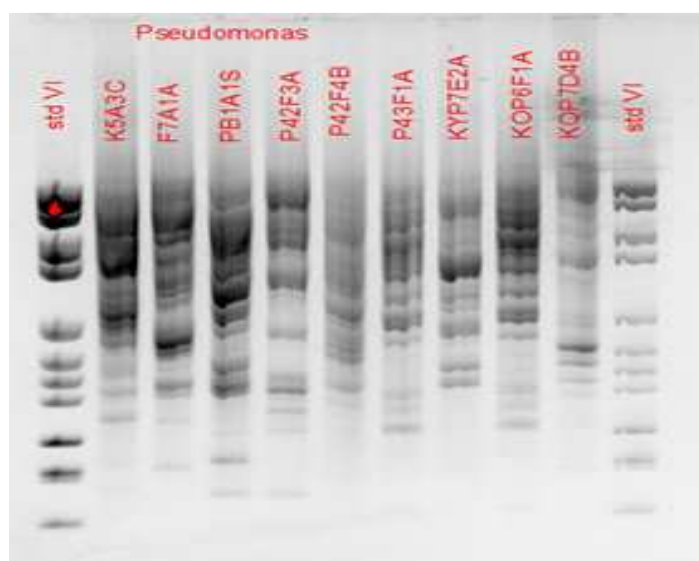
Figur 4.28 Genotyping av *Lactobacillus* og *Leuconostoc* med RAPD-PCR.



Figur 4.29 Genotyping av *Pseudomonas* med RAPD-PCR.



Figur 4.30 Genotyping av *Lactobacillus* og *Leuconostoc* med rep-PCR.



Figur 4.31 Genotyping av *Pseudomonas* med rep-PCR.

Tabell 4.7 Oppsummerte resultater fra typing med RAPD-PCR og rep-PCR. Tabellen viser kilden isolatene er plukket fra, 16S identifisering og nummererte typingsprofiler.

Isolat	Kilde	16S identifisering	Profiler typing		
			RADP-PCR	rep-PCR	RAPD-PCR + rep-PCR
9A2B	Blå/hvite strikker før produksjon (produsent 1)	<i>Lactobacillus</i>	RAPD1	Rep1	1-1
B11A	Røkt skinke*	<i>Lactobacillus</i>	RAPD 2	Rep2	2-2
B12	Røkt skinke*	<i>Lactobacillus</i>	RAPD 3	Rep3	3-3
KY13B	Kyllingpålegg*	<i>Lactobacillus</i>	RAPD 4	Rep4	4-4
P42F1A	Pepperskinke**	<i>Lactobacillus</i>	RAPD 4	Rep5	4-5
P43D1A	Pepperskinke**	<i>Lactobacillus</i>	RAPD5	Rep6	5-6
7B2A	Påleggsavlaster under prod. av pepperskinke	<i>Leuconostoc</i>	RAPD6	Rep7	6-7
7B2B	Påleggsavlaster under prod. av pepperskinke	<i>Leuconostoc</i>	RAPD7	Rep7	7-7
PP12A	Pepperskinke*	<i>Leuconostoc</i>	RAPD6	Rep7	6-7
BP12A	Røkt skinke*	<i>Leuconostoc</i>	RAPD6	Rep7	6-7
KY11A	Kyllingpålegg*	<i>Leuconostoc</i>	RAPD8	Rep8	8-8
P42D6A	Pepperskinke**	<i>Leuconostoc</i>	RAPD9	Rep7	9-7
P42E2A	Pepperskinke**	<i>Leuconostoc</i>	RAPD9	Rep7	9-7
KYP6D2A	Kyllingpålegg**	<i>Leuconostoc</i>	RAPD6	Rep9	6-9
KYP7E1C	Kyllingpålegg**	<i>Leuconostoc</i>	RAPD6	Rep10	6-10
KOP7E2B	Kokt skinke**	<i>Leuconostoc</i>	RAPD6	Rep9	6-9
K5A3C	Valser før produksjon (produsent 2)	<i>Pseudomonas</i>	RAPD10	Rep11	10-11
F7A1A	Oppsamlingsbord før produksjon (produsent 2)	<i>Pseudomonas</i>	RAPD11	Rep12	11-12
PB1A1S	Hel pepperskinke*	<i>Pseudomonas</i>	RAPD12	Rep13	12-13
P42F3A	Pepperskinke**	<i>Pseudomonas</i>	RAPD13	Rep14	13-14
P42F4B	Pepperskinke**	<i>Pseudomonas</i>	RAPD14	Rep15	14-15
P43F1A	Pepperskinke**	<i>Pseudomonas</i>	RAPD15	Rep16	15-16
KYP7E2A	Kyllingpålegg**	<i>Pseudomonas</i>	RAPD16	Rep17	16-17
KOP6F1A	Kokt skinke**	<i>Pseudomonas</i>	RAPD15	Rep18	15-18
KOP7D4B	Kokt skinke**	<i>Pseudomonas</i>	RAPD17	Rep19	17-19

*Pålegg fra lagringsforsøk 1

**Pålegg fra lagringsforsøk 2

5 Diskusjon

5.1 Bakterienivå hos produsenter og på produkter

Bakterie-,typer og nivå ble kartlagt i kjøttpålegg og på overflater i produksjonsanlegg hos produsent 1 og 2. Prøvene ble platet ut på næringsmediene PCA og MRS og inkubert både aerobt og anaerobt. Da det ikke var signifikant forskjell ($p>0,05$) i bakterienivå mellom næringsmedier og inkuberingsforhold, ble det avgjort å identifisere kolonier hovedsaklig fra PCA inkubert aerobt. PCA er et næringsmedie som ikke er selektiv for spesifikke mikroorganismer, og ble antatt å gi et representativt bilde av alle bakteriene tilstede i prøvene. Bakterier som krever spesifikke næringskrav for vekst vil i mindre grad bli påvist på PCA. Dette kan ha ført til at enkelte forringere ikke ble påvist.

5.1.1 Bakterienivåer hos produsent 1 og 2

Resultatene fra prøvetakning hos produsent 1 og 2 viste at det var ulikheter i bakterienivå mellom forskjellige kjøttbedrifter (Figur 4.1, Figur 4.2 og Figur 4.3). Hos produsent 2 hadde begge produksjonslinjene, som er uavhengige linjer, lave bakterienivåer både før og under slicing av produktene, sammenlignet med produksjonslinjen hos produsent 1. Bakterienivået var spesielt høy under slicing av pepperskinke (produsent 1).

Vask av produksjonslinjen etter slicing av pepperskinke hos produsent 1 var effektiv, da bakterienivået var lavere under slicing av røkt skinke.

Produsent 1 hadde gjennomsnittlig høyere bakterienivå på overflater som var i direkte kontakt med produktene, sammenlignet med overflater som ikke var kontaktflater (Tabell 4.1). Hos produsent 2 var tilfellet motsatt for begge produksjonslinjene; bakterienivået var lavest på produktkontaktflater og høyest på overflater som ikke var i direkte kontakt med produktene (Tabell 4.2 og Tabell 4.3).

Produsent 1 har høyere grad av manuell håndtering av produktene sammenlignet med produsent 2. Hos produsent 1 ble blant annet hele kjøttprodukter sprettet opp for hånd. Dette krever sprettekniv, sprettebord og skjærefjøl, som er de første kontaktflatene for kjøttproduktene. Økt manuell håndtering gir trolig også økt sjanse for smitte av kjøttpålegget. Eventuelle bakterier fra emballasjen som produktet er pakket inn i, kan bli overført til sprettekniven og skjærefjølen, og videre til kjøttet før det flyttes manuelt over til transportbåndet før slicing. Dette kan igjen føre til videre kontaminering av produksjonslinjen. Manuell håndtering kan være en årsak til høyere bakterienivå på produktkontaktflater under produksjon hos produsent 1.

Hos produsent 1 ble det i tillegg til kjøttpålegg, oppbevart og prosessert andre råvarer som ost og spekemat. Disse produktene kan gi økt risiko for smitte mellom ulike typer råvarer, og bidra til et større mangfold av bakterier generelt i produksjonslokalet.

Hos produsent 2 var det høyere grad av automatisk håndtering av pålegg ved slicing og pakking. Emballasjen som hele påleggsstykker var pakket inn i, ble fjernet automatisk i første ledd av produksjonslinjen ved begge produksjonslinjene. Dette gir redusert manuell håndtering og reduserer faren for kontaminering.

Det var ikke mulig å avdekke konkrete årsaker til forskjeller i bakterienivå på overflater hos produsent 1 og 2, men er trolig en kombinasjon av flere faktorer, som grad av manuell/ automatisk håndtering av produktene, hygienetiltak utført gjennom produksjonsprosessen, utforming av produksjonslinjen og anlegget generelt, renholdsrutiner før og under produksjon, samt ulike produksjonsrutiner.

5.1.2 Bakterienivå i kjøttpålegg

Bakterienivået i pepperskinke lagret uåpnet ved 4°C (lagringsforsøk 1), ble målt ved utløpsdato, 7, 17 og 23 dager over utløpsdato. Bakterienivået ved første lagringstid var log 8,5 CFU/g og synker til log 8,3 CFU/g 1 uke over utløpsdato. Ved 17 og 23 dager over utløpsdato økte bakterienivået til henholdsvis log 8,5 CFU/g og log 8,9 CFU/g. Ved åpning av påleggspakker og lagring ved høyere temperatur (lagringsforsøk 2) var bakterienivået i pepperskinke relativt stabilt gjennom hele lagringsperioden, også ved ulike lagringsbetingelser. Lagring av åpne og lukkede pakker viste liten forskjell i bakterienivå. Ved samtlige lagringsbetingelser var bakterienivået ca log 8,5 CFU/g for pepperskinke, med unntak av påleggspakken lagret åpnet til utløpsdato ved 4°C og tidvis lagret ved 25°C, var bakterienivået lavere (log 6,7 CFU/g).

Bakterienivå i pepperskinke lagret uåpnet ved 8°C blir noe redusert fra utløpsdato til 1 uke over utløpsdato, fra log 8,7 CFU/g, til log 8,5 CFU/g. Det stabile bakterienivået i pepperskinke ved både åpne og lukkede pakker, og ved lave (4°C) og høye (8°C) lagringstemperaturer, kan tyde på at bakterienivået allerede ved utløpsdato er nær maksimum og vil derfor ikke utvikle seg ved lengre lagringstid, høyere lagringstemperatur eller ved å åpne pakkene slik at oksygen blir tilgjengelig for bakteriefloraen på pålegget. Det var ikke signifikante forskjeller ($p > 0,05$) i bakterienivå (log CFU/g) fra utløpsdato til en uke over utløpsdato. Tilsvarende gjaldt for røkt skinke hvor bakterienivået endret seg lite ved lagring over lengre tid (Figur 4.5).

Bakterienivået i hel pepperskinke ved utløpsdato, lå på log 4 CFU/g i kjernen av blokken, log 4,7 CFU/g på overflate. Det var nærmere 100.000 ganger høyere bakterienivå i skivet pepperskinke i forhold til hel pepperskinke på utløpsdato (Figur 4.6). Dette kan tyde på at slicing og pakking av

pepperskinke bidrar til å overføre bakterier fra produksjonsmiljøet til ferdig produkt. Hel pepperskinke har vært varmebehandlet, men bakterienivået kan tyde på at varmebehandlingen ikke har vært tilstrekkelig, eller at det har vært kryssmitte av skinken etter varmebehandling. Siden det ble tatt prøver av kun to hele pepperskinker, bør resultatene bekreftes med flere gjentak.

Bakterienivå i kyllingpålegg var høyt ved alle lagringstider, særlig ved 1 uke over utløpsdato lagret åpnet ved 8°C / 25°C (log 9 CFU/g). Dette var det høyeste bakterienivået oppnådd sammenlignet med alle påleggstypene (Figur 4.15). Sammensetning av bakterieflora vil være påvirket av råvaren som pålegget er produsert av. Bakteriefloraen i kylling kan bestå av andre mikroorganismer enn bakteriefloraen i svin, som kan være en årsak til høyere bakterienivå i kyllingpålegg. Andre faktorer som kan påvirke bakterienivået er konserveringsmidler, pH i produktet og pakkemetoden.

Bakterienivå i kokt skinke (lagringsforsøk 1) var under deteksjonsgrensen (<log 5 CFU/g) ved både utløpsdato, 7 og 38 dager over utløpsdato for produkt lagret uåpnet ved 4°C (Figur 4.5). Det var forventet et høyere bakterienivå i kokt skinke og fortynningene hadde deteksjonsgrense på log 5 CFU/g. Dette var også tilfellet for servelat ved utløpsdato.

Kokt skinke (lagringsforsøk 2) lagret uåpnet ved 4°C to uker før utløpsdato viste høyere bakterienivå (log 4,7 CFU/g) enn ved utløpsdato (log 3,8 CFU/g). Årsaken til høyere bakterienivå 2 uker før utløpsdato i forhold til utløpsdato er uvisst (Figur 4.14). En mulig forklaring kan være forskjeller i bakterienivå mellom skivene i pakken, eller feilaktig utført fortynninger og utsåing.

Både kokt skinke lagret åpnet ved 8°C og 8°C/25°C viste en reduksjon i bakterienivået fra utløpsdato til 1 uke over utløpsdato. For kokt skinke lagret åpnet ved 4°C og 4°C/25°C er tilfellet motsatt, og bakterienivået økte fra utløpsdato til en uke over utløpsdato. Dette kan tyde på at bakterieveksten skjer raskere ved 8°C, enn ved 4°C, og at bakterienivået har nådd sitt maksimum raskere ved høyere temperatur (8°C). Tilgang på nødvendige næringsstoffer kan være avgjørende for å begrense maksimum for bakterievekst. Lagring utover dette tidspunktet fører til celledød og bakterienivået blir redusert.

Bestemmelse av bakterienivå i servelat ble utført på utløpsdato, 7, 14 og 27 dager over utløpsdato (Figur 4.5). I servelat (misfarget/A2) var bakterienivå fra utløpsdato til 1 uke over utløpsdato relativt stabilt (fra log 8,5 CFU/g til log 8,6 CFU/g), og økte fram til 14 dager over utløpsdato (log 9,2 CFU/g). Etter 27 dager over utløpsdato var det en nedgang i bakterienivået

(log 7,5 CFU/g). En mulig årsak til dette kan være at det fortsatt er næringsstoffer tilgjengelig for bakterievekst etter 1 uke over utløpsdato, slik at populasjonen øker. Ved 27 dager over utløpsdato har bakterienivå blitt redusert, noe som kan tyde på at få slekter har oppnådd dominans. Begrenset tilgang på næringsstoffer kan ha ført til celledød.

Uavhengig av lagringsbetingelser økte ikke bakterienivå utover log 9 CFU/g for samtlige påleggsprodukter. Tidligere studier har vist at maksimum bakterienivå ved forringet kjøttprodukt lagret ved kjøleskapstemperatur ikke oversteg log 9 CFU/g (Borch *et al.* 1996; Gram *et al.* 2002).

5.2 Påviste bakterier hos produsenter og i kjøttpålegg

Identifisering av kolonier fra overflater hos produsentene ble utført for å bestemme bakterieflora tilstede i produksjonsanleggene. Utvalgte kolonier fra pålegg ved spesifikke lagringstider ble også identifisert for å kunne kartlegge eventuelle forringere. Det var ønskelig å se på sammenhengen mellom bakterier i produksjonsanlegg og bakterier i kjøttpålegg. Det ble utført identifisering via både dyrkingsavhengig og dyrkingsuavhengig analyse av pålegg. Koloniene ble plukket hovedsakelig fra PCA inkubert aerobt. Kolonier med unik morfologi fra MRS inkubert aerobt ble også identifisert. Tabell 4.4, Tabell 4.5 og Tabell 4.6 viser identifiserte kolonier fra henholdsvis produsenter, pålegg fra lagringsforsøk 1 og 2.

5.2.1 Påviste bakterier hos produsent 1, pepperskinke og røkt skinke

Hos produsent 1 ble bakterieslektene *Lactobacillus* (n=2), *Staphylococcus* (n=1), og *Pseudomonas* (n=1), påvist før produksjonsstart ved dyrkbar analyse. Dyrkningsuavhengig analyse av prøvepunktene fra produsent 1 ble ikke utført. *Lactobacillus* er den eneste bakterieslekten som ble påvist både før og under produksjon, og i begge påleggstypene. *Lactobacillus* ble påvist på blå/hvite strikker, som er en del av transportbåndet. Alle produktene passerer dette området, og det kan tyde på at *Lactobacillus* ble overført til produktet i løpet av slicing og pakking. *Leuconostoc* ble påvist under produksjon av pepperskinke og i både pepperskinke og i røkt skinke.

I pepperskinke lagret åpnet ble det påvist *Pseudomonas*, *Leuconostoc*, *Janthinobacterium*, *Lactobacillus* og *Micrococcus* ved dyrkingsavhengig analyse. *Carnobacterium* ble påvist under produksjon av pepperskinke, men ikke i produkt lagret åpnet. Bakteriene påvist i pålegg kan ha vært tilstede før produksjon, men ikke blitt påvist. Det er derfor uklart hvilke prøvepunkter som er smitekilden til pålegget.

Ved dyrkingsuavhengig analyse ble også *Leuconostoc*, *Lactobacillaceae* og *Lactobacilliales* påvist i pepperskinke. Slekten *Lactobacillus* påvist ved dyrkbar analyse, er klassifisert under ordenen *Lactobacillales* og familien *Lactobacillaceae*. Påvisning av de sistnevnte stemmer overens med påvisning av *Lactobacillus* ved dyrkbar analyse. Sekvensering av et begrenset område på 16S rDNA, differensierte ikke alle bakterier på slektsnivå. For å oppnå dette er det nødvendig med mer dyptgående sekvensering (dette ble ikke utført i denne studien).

Pepperskinke viste relativt stabile nivå av de ulike bakterieslektene ved samtlige lagringsforhold, da *Leuconostoc* og *Lactobacillaceae* utgjorde store deler av total bakterieflora. Pepperskinke lagret ved 8°C og tidvis ved 25°C ved utløpsdato, hadde den høyeste andelen *Lactobacillaceae* (omtrent 75% av total bakterieflora) sammenlignet med bakteriefloraen ved resterende lagringsforhold.

Det ble påvist *Pseudomonas* ved dyrkingsuavhengig analyse, fra hel pepperskinke, men ikke i skivet, uåpnet pepperskinke. Derimot ble en liten andel *Pseudomonas* (nivå ca 1%) påvist ved dyrkingsuavhengig analyse i skivet pepperskinke lagret åpnet ved 4°C ved utløpsdato. Tidligere studier (Borch *et al.* 1996; Nychas *et al.* 2008) har vist at *Pseudomonas* kan være tilstede i luftpakket og vakuumpakket kjøttpålegg, men ikke i MAP. Dersom *Pseudomonas* ble overført til produktene i løpet av produksjonen, vil de i liten grad hatt evne til å vokse i dette miljøet, da *Pseudomonas* er avhengig av oksygen for god vekst. Ved åpning av pakken vil imidlertid tilgang til oksygen gi vekstmuligheter for *Pseudomonas*, som kan ha vært tilstede i pakken. *Pseudomonas* ble påvist på gulv/undersiden av linjen, men det er liten sannsynlighet for kontaminering av produktene fra gulvet.

I røkt skinke ble *Leuconostoc* og *Carnobacterium* påvist ved dyrkbar og dyrkingsuavhengig analyse. I tillegg ble *Lactobacillus* og *Micrococcus* påvist ved dyrkbar analyse, mens *Lactobacillaceae* og *Lactobacilliales* ble påvist ved dyrkingsuavhengig analyse. *Micrococcus* ble ikke påvist ved prøvetaking av produksjonslinjen, men er tilstede i både pepperskinke og røkt skinke. Dette tyder på at *Micrococcus* kan ha vært tilstede i produksjonsmiljøet, men det er uvisst hvilket prøvepunkt som var smitekilden.

5.2.2 Påviste bakterier hos produsent 2, kyllingpålegg, kokt skinke og servelat

Før produksjon av kyllingpålegg ble det påvist *Pseudomonas* på oppsamlingsbordet. Dette var det eneste prøvetakningspunktet fra denne produksjonslinjen hvor det ble påvist bakterier.

Dyrkingsuavhengig analyse av prøvepunktene fra produsent 2 ble ikke utført. *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Karlingiomyces*, *Staphylococcus* og *Brochothrix* ble påvist ved utløpsdato i lukkede pakker av kyllingpålegg lagret ved 4°C ved dyrkbar analyse. *Pseudomonas* ble påvist i

produkter lagret åpnet og var den eneste bakterien påvist før produksjon og i produktet. Dette tyder på at *Pseudomonas* kan ha blitt overført til produktet via oppsamlingsbordet. Påviste bakterier i produktet kan ha vært tilstede på prøvetatte overflater, men ikke blitt fanget opp, eller de kan ha vært tilstede ved andre overflater ved produksjonslinjen som ikke ble prøvetatt. Det er derfor uklart hvilken kilde bakteriene ble overført fra.

Ved dyrkingsuavhengig analyse av kyllingpålegg ble det ikke påvist muggsoppen *Karlingiomyces* eller *Staphylococcus*, men det ble påvist flere ulike bakterier, og dermed høyere diversitet i bakteriefloraen ved denne analysen enn ved dyrkbar analyse. Det er derfor større sikkerhet i resultatene fra dyrkningsuavhengig analyse.

Dyrkningsuavhengig analyse viste at det var forskjeller i bakterieflora i kyllingpålegg i påleggspakkene åpnet 2 uker før utløpsdato, til tross for at samtlige påleggspakker var lagret og behandlet på samme måte (Figur 4.27). Da utgangspunktet i bakteriefloraen var forskjellig, har de også endret seg ulikt over tid (fra åpning til utløpsdato). Det ble påvist at *Leuconostoc* dominerte i de fleste uåpnede påleggspakkene, med unntak av pakken lagret uåpnet ved 8°C. I pakke a, b og c har nivå av *Leuconostoc* blitt redusert, mens i pakke d har nivået holdt seg stabilt. Grunnen til reduksjon av *Leuconostoc*, kan være at tilgang på oksygen og økte lagringstemperaturer ga gode vekstvilkår for *Carnobacteriaceae*, *Carnobacterium* og *Brochothrix*, og utkonkurrerte en andel *Leuconostoc*. I kyllingpålegg lagret uåpnet ved 8°C, var nivået av *Leuconostoc* nesten ikke eksisterende, mens 1 uke senere dominerte *Leuconostoc* bakteriefloraen (70% av totalnivå). Dette tyder også på at anaerobe forhold gir bedre vekst av *Leuconostoc*, sammenlignet med aerobe forhold i kyllingpålegg. Tidligere studier har vist at *Leuconostoc* ofte blir påvist i kjøttpålegg lagret ved anaerobe forhold (Borch *et al.* 1996; Nychas *et al.* 2008).

Kyllingpålegg var den påleggstypen som viste det høyeste nivået av diversitet ved dyrkingsuavhengig analyse, og høye bakterienivå (CFU/g), sammenlignet med de andre påleggstypene. De andre påleggstypene bestod hovedsakelig av svinekjøtt, og råvaren kan være en faktor som er årsaken til ulikheter i bakterienivå og bakterieflora. Ulike råvarer gir ulike egenskaper for bakterievekst, som f.eks mengde fritt vann tilgjengelig for vekst, pH-verdien i kjøttet, og næringsstoffer som bakteriene trenger for å utføre metabolisme. I tillegg kan ulikheter i hygieneforhold og produksjonsrutiner påvirke utvikling av bakteriefloraen.

Før produksjon av kokt skinke ble det påvist *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Jeotgalicoccus*, *Raoultella*, *Serratia* og *Enterococcus*. Produksjonslinjen til kokt skinke viste størst diversitet av bakterier før produksjonsstart. Kokt skinke ble i mindre grad

påvirket av bakterienes tilstedeværelse ved produksjonslinjen. En årsak til dette kan være at en mindre andel av bakteriene ble overført til produktene, eller at konserveringsmidler tilsatt i produktet og pakkemetoden (MAP) begrenset vekst av organismene nevnt ovenfor (Nychas *et al.* 2008). Ved dyrkbar analyse av kokt skinke ble det ikke detektert bakterier ved utløpsdato og 1 uke over utløpsdato, da nivået var under deteksjonsgrensen ($<\log 5$ CFU/g), med unntak av 1 *Micrococcus* 1 uke over utløpsdato. Både *Leuconostoc* og *Carnobacterium* ble påvist ved dyrkbar og dyrkningsuavhengig analyse av kokt skinke lagret åpnet. Ordenen *Lactobacilliales* og familien *Lactobacillaceae* ble påvist ved dyrkningsuavhengig analyse, og slekten *Lactobacillus* ved dyrkbar analyse på kokt skinke. Det er derfor en mulighet at *Lactobacillus* også var tilstede ved dyrkningsuavhengig analyse, da *Lactobacillus* er klassifisert under familien *Lactobacillaceae*. Det er uvisst hva som var smitekilden til *Micrococcus*, da den ikke ble påvist ved produksjonslinjen. Den kan ha vært tilstede ved andre overflater ved linjen som ikke ble prøvetatt.

Da *Carnobacterium* og *Lactobacillus* ble påvist på skumvalsen ved produksjonslinjen etter renhold, er det en mulighet for at dette punktet var smitekilden. *Lactobacillus* ble også påvist på røde og gule strikkbånd (transportbånd), og det er derfor en mulighet at dette prøvepunktet også kan ha vært smitekilden til kokt skinke.

Ved dyrkbar analyse ble det påvist *Pseudomonas* og *Janthinobacterium* i kokt skinke lagret åpnet. Disse ble ikke påvist ved dyrkningsuavhengig analyse. På skumvalsen ved produksjonslinjen av kokt skinke ble det påvist *Pseudomonas* for produksjonsstart. Dette punktet er ikke i kontakt med produktet, men det kan ha vært smitekilden for kokt skinke. Da *Janthinobacterium* ikke ble påvist før produksjonsstart, kan den ha vært tilstede ved andre overflater ved produksjonslinjen hos produsent 2 som ikke ble prøvetatt.

I kokt skinke som ble lagret åpnet og tidvis ved 25°C, dominerte *Leuconostoc*, mens *Carnobacteriaceae* dominerte i påleggspakkene lagret ved 4°C og 8°C (Figur 4.26). Bakterienivået i påleggspakkene a og b som ble åpnet to uker før utløpsdato var under deteksjonsgrensen.

Prøvetaking av linjen hvor serverlat ble skivet og pakket ble ikke utført grunnet tidsmangel. I serverlat ble det funnet *Leuconostoc*, *Carnobacterium* og *Staphylococcus* 27 dager over utløpsdato og *Leuconostoc* og *Lactobacillus* 14 dager over utløpsdato ved dyrkbar analyse (Tabell 4.5). Det ble påvist stor diversitet i bakteriefloraen hos serverlat ved dyrkningsuavhengig analyse, også i serverlat (A1) som var under deteksjonsnivå ved utløpsdato ved dyrkbar analyse (Figur 4.23). En årsak til at dyrkbar analyse ikke ga resultater, skyldes antageligvis

fortynningsfeil utført før utplating. I servelatpakkene (A1 og A2) er det ulikheter i bakterieflora ved utløpsdato (Figur 4.23). Disse pakkene er fra forskjellige batch-nummer, men har blitt lagret på samme måte før mikrobiologisk analyse ble utført. Servelat A2 var misfarget før pakken ble åpnet, og kan ha vært en årsak til ulik bakterieflora i forhold til servelat A1. Dette tyder på at det er varierende bakterieflora og produktkvalitet mellom forskjellige batch-nummer. Resultatene indikerer at gjentak av prøvene er nødvendig, for å oppnå større sikkerhet i dataene, slik at ikke tilfeldige resultater gir store utslag. Servelat er et farseprodukt som består av svin-, og storfekjøtt. Dette kan være en årsak til den høye diversiteten i produktet.

Kyllingpålegg og kokt skinke fra lagringsforsøk 2 viste at det var ulikheter i bakterieflora og bakterienivå i pålegg ved første uttak (to uker før utløpsdato) fra samme batch-nummer, som ble lagret og behandlet på samme måte. To av pakkene med kokt skinke (a og b) var under deteksjonsgrensen to uker før utløpsdato (Figur 4.26). Derimot ble det påvist ulik bakterieflora ved samme tidspunkt i pakkene c og d (som ble lagret på lik måte som pakkene a og b). I pakke c dominerte *Leuconostoc*, mens *Carnobacteriaceae* dominerte i pakke d. En årsak til dette kan være at det er utfordringer med produktkvalitet for kokt skinke og kyllingpålegg. En annen årsak kan være at de prøvetatte produktene tilfeldigvis ble pakket med stort tidsintervall, slik at en av pakkene ble slicet og pakket tidlig, mens den andre ble prosessert senere på dagen. Produksjonslinjene hos produsent 2 ble daglig rengjort etter at produksjonen ble avsluttet. Dette kan ha ført til at de få bakteriene som var tilstede etter vask og tidlig i prosessen fikk tid til å formere seg, og bakterienivået ved produksjonslinjen økte over tid og ble i større grad overført til produktene som ble slicet og pakket utover dagen. Det ble prøvetatt få påleggspakker og ulikhetene kan ha vært tilfeldig.

Det ble påvist noe ulik bakterieflora i pålegg lagret åpnet og lukket, til tross for at de fleste av bakteriene hadde evne til å vokse både med og uten oksygen. Bakteriene *Pseudomonas* og *Janthinobacterium* ble påvist i påleggspakker som hadde vært lagret åpnet. *Karlingiomyces* (muggsopp) ble påvist i lukket påleggspakke ved dyrkbar analyse. Bakteriene *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Micrococcus*, *Brochothrix* og *Staphylococcus* ble påvist ved både anaerob og aerob lagring av kjøttpålegg.

Dyrkbar og dyrkingsuavhengig analyse påviste ulik bakterieflora i ulike typer kjøttpålegg. Identifisering av plukkede kolonier basert på morfologi kan ha gitt en upresis oversikt over bakterier tilstede, da det ble påvist at kolonier med synlig lik morfologi ble identifisert som forskjellige bakterier. Plukking fra PCA inkubert aerobt kan i tillegg ha ført til at viktige forringere dyrket på MRS ikke ble identifisert. Dyrkningsbetingelsene ved dyrkbar analyse kan i

tillegg ha ført til seleksjon av spesifikke bakterier, og hemmet vekst av andre bakterier tilstede i prøven. Ved dyrkningsuavhengig analyse ble det påvist høyere diversitet i pålegg enn ved dyrkbar analyse. Det ble også påvist bakterier ved dyrkningsuavhengig analyse i flere av prøvene som ikke ga vekst ved dyrkbar analyse. Dette tyder på at dyrkningsuavhengig analyse i større grad påviste den reelle diversiteten i kjøttpålegg enn de dyrkbare analysene utført i denne studien.

5.3 Sensorisk bedømmelse

I sensorisk bedømmelse av pålegg fra lagringsforsøk 1, var det relativt små utslag i intensitet av sensoriske egenskaper ved ulike lagringstider (Figur 4.7- Figur 4.11). Dette tyder på at produktene i mindre grad ble forringet ved 4°C i uåpnede pakninger, også ved lenge tid over utløpsdato. I følge Mattilsynet er optimal temperatur for oppbevaring av kjøttpålegg under 4°C (Mattilsynet 2008), som var lagringstemperaturen benyttet i lagringsforsøk 1. I både pepperskinke, røkt skinke 1 uke over utløpsdato, kyllingpålegg og i servelat 27 dager over utløpsdato ble det påvist dominans av *Leuconostoc* ved dyrkningsuavhengig analyse. Disse påleggstypene viste høye nivåer av sensoriske egenskaper forbundet med god kvalitet. Dette kan tyde på at *Leuconostoc* ikke er en forringer i uåpnet kjøttpålegg.

Servelat 14 dager over utløpsdato var mer fermentert enn servelat 27 dager over utløpsdato. Ved dyrkningsuavhengig analyse ble det påvist dominans av *Lactobacillaceae* (83% av totalnivå) i 14 dager over utløpsdato, og *Leuconostoc* (86% av totalnivå) i 27 dager over utløpsdato (Figur 4.11). Dette tyder på at *Lactobacillaceae*, muligens slekten *Lactobacillus*, påvirker fermentering i kjøttpålegg i større grad enn *Leuconostoc*. Det er kjent at *Lactobacillus* produserer melkesyre som gjør at kjøttpålegg blir fermentert, mens *Leuconostoc* produserer hydrogenperoksid som gir kjøttet grønnlig farge (Borch *et al.* 1996; Nychas *et al.* 2008).

I servelat-pakkene A1 og A2 (utløpsdato) ble det påvist forskjeller i både bakterieflora og i sensoriske egenskaper. Disse pakkene hadde ulike batch-nummer. Dette tyder på at det er ulikheter i bakterie-, nivå og flora mellom pålegg fra forskjellige batch-nummer. Disse forskjellene gjenspeilet seg i sensorisk bedømmelse, og indikerer trolig kvalitetsforskjeller mellom ulike pakker av servelat. Ulikhetene kan skyldes egenskapene i produktet eller produksjonsforhold.

Det ble påvist sensoriske forskjeller mellom utløpsdato og referansepakken for servelat, pepperskinke, røkt skinke og kyllingpålegg. Dette tyder på at bakteriene i lukket pakning vokser gradvis over tid fra produktet blir pakket. Det er påvist at blant annet melkesyrebakterier og *Brochothrix* har evne til å vokse i MA med CO₂ (Nychas *et al.* 2008), hvilket også er tilfellet for

disse produktene. Melkesyrebakterier ble påvist i alle påleggstypene som var lagret uåpnet, og *Brochothrix* ble påvist i kyllingpålegg og pepperskinke.

Kokt skinke fra lagringsforsøk 1 var det pålegget som gjennom hele lagringsperioden viste høyest nivå av positive egenskaper og lavest nivå av egenskaper forbundet med forringelse (Figur 4.8). Bakterienivå i kokt skinke var under deteksjonsgrensen ($<\log 5$ CFU/g) ved utløpsdato, 7 og 38 dager over utløpsdato ved dyrkbar og dyrkningsuavhengig analyse. Det var forventet et høyere nivå av bakterier og deteksjonsgrensen var derfor høy. Det er uvisst hvilke bakterieslekter som ga høye nivå av egenskaper som er forbundet med god kvalitet i kokt skinke.

Bedømmelse av pålegg fra lagringsforsøk 2 viste større variasjon i intensiteten til de sensoriske egenskapene. Pepperskinke (Figur 4.18) og særlig kyllingpålegg (Figur 4.16), viste høy intensitet av fermentert og emmen lukt i pålegg lagret åpnet ved 8°C og inkubert ved 25°C to timer daglig. Dyrkningsuavhengig analyse viste at bakteriefloraen i pepperskinke var dominert av *Lactobacillaceae* (71% av totalnivå), og en mindre andel *Leuconostoc* (20% av totalnivå). Kyllingpålegg var derimot dominert av *Leuconostoc* (55% av totalnivå), *Carnobacterium* (31% av totalnivå) og en mindre andel *Brochothrix* og *Pseudomonas*. Tidligere studier har vist at dette er kjente bakterier knyttet til forringelse av varmebehandlet kjøttpålegg (Borch *et al.* 1996; Gram *et al.* 2002; Nychas *et al.* 2008). Ubehagelige lukter og smaker, samt misfarging av kjøttet er typiske defekter som er forårsaket av forringelsesbakterier (Nychas *et al.* 2008).

Åpnet kokt skinke som tidvis ble lagret ved 25°C ble oppfattet som nokså fermentert, og det ble påvist dominans av *Leuconostoc*. Kokt skinke lagret ved 8°C ved utløpsdato viste det høyeste nivået av fermentert lukt, og var dominert av *Carnobacteriaceae* (92% av totalnivå). Kokt skinke (Figur 4.17) fremsto som mest forringet ved åpnet produkt lagret ved 8°C, og har i mindre grad blitt påvirket av inkubering ved 25°C to timer daglig, i forhold til pepperskinke og kyllingpålegg. I pepperskinke og kokt skinke ble det påvist få slekter ved dyrkningsuavhengig analyse ved samtlige lagringsforhold. Fra lagringsforsøk 2 hadde pepperskinke det laveste nivået av fermentert og emmen lukt sammenlignet med de andre påleggstypene. Kokt skinke og pepperskinke lagret ved 8°C og inkubert 25°C to timer daglig hadde tilsvarende bakterieflora som pålegg som ble åpnet to uker før utløpsdato. Det ble ikke gjennomført sensorisk bedømmelse av pålegg ved dette tidspunktet, men det er antatt at det ikke fremstår som forringet. I begge disse påleggstypene ble det påvist få bakterieslekter ved dyrkningsuavhengig analyse, som varierte lite gjennom hele lagringsforsøket, særlig for pepperskinke. Sensorisk bedømmelse av kokt skinke viste både negativ og positiv sensorikk av omtrent samme bakterieflora som ble påvist ved ulike lagringsforhold. Tilsvarende var tilfellet for pepperskinke. Det er derfor uvisst

hvilke bakterieslekter som i større grad påvirket fermentering i pepperskinke og kokt skinke som var lagret åpnet.

5.4 Genotyping

Genotyping ble utført for å evaluere diversiteten av like bakterieslekter påvist fra ulike kilder (produksjonsanlegg og pålegg). Det var ønskelig å oppnå mer kunnskap om diversiteten innad i hver bakterieslekt, og tilstedeværelse av like og forskjellige stammer i de ulike påleggstypene.

Ingen av *Lactobacillus* påvist hos produsent 1 (blå/hvite strikker), i pepperskinke eller i røkt skinke hadde lik typingsprofil ved verken RAPD-PCR eller rep-PCR. Dette tyder på at det var ulike stammer av *Lactobacillus* som ble påvist fra de ulike kildene. Til tross for at ulike stammer ble påvist, kan like stammer ha vært tilstede, da det er tilfeldig hvilke kolonier som ble plukket til identifisering. Derimot hadde to *Lactobacillus*, en fra pepperskinke og en fra kyllingpålegg, samme profil. Disse produktene var fra hvert sitt produksjonsanlegg, og det kan tyde på at det er like stammer tilstede i forskjellige produksjonsanlegg.

To stammer *Leuconostoc* ble påvist på påleggsavlaster under produksjon av pepperskinke med samme profil med rep-PCR (Rep 7), og ulike profiler med RAPD-PCR (RAPD 6, RAPD 7). To stammer, en fra pepperskinke og en fra røkt skinke hadde også disse profilene (rep 7, og RAPD 6). Det kan tyde på at disse bakteriene er like på stamme-nivå, slik at *Leuconostoc* fra påleggsavlaster ble overført til pepperskinke og røkt skinke i løpet av produksjonen.

To andre *Leuconostoc* påvist i pepperskinke hadde RAPD-profil 6, samme som en av de påviste *Leuconostoc* på påleggsavlaster hos produsent 1. Disse hadde samme profil ved rep-PCR (rep 7) som de nevnte ovenfor. Dette kan tyde på at påleggsavlasteren var smittekilden til pepperskinke.

I kyllingpålegg og kokt skinke fra produsent 2 ble det påvist *Leuconostoc* med samme profil som *Leuconostoc* fra pepperskinke, røkt skinke og påleggsavlaster hos produsent 1. Det tyder på at dette er en stamme som er påvist i pålegg fra begge produsentene.

Rep-PCR viste at alle påviste *Pseudomonas* hadde ulike profiler. RAPD-PCR derimot, viste at to av stammene, en fra pepperskinke og en fra kokt skinke, hadde samme profil. Disse påleggstypene er fra ulike produsenter. Det er derfor uvisst smittekilden til *Pseudomonas*, da påviste *Pseudomonas* fra produksjonsanleggene hadde forskjellige profiler i forhold til stammene påvist i pålegg. *Pseudomonas* viste størst diversitet på stammenivå sammenlignet med *Leuconostoc* og *Lactobacillus*.

Det ble påvist ulike typingsprofiler mellom bakterier fra samme slekt. Dette tyder på at det er genetisk variasjon innad i bakterieslektene som ble påvist i produksjonsmiljø og i pålegg. I visse tilfeller ble imidlertid samme stamme, basert på begge typingsmetodene, påvist fra både produksjonsanlegget og i påleggsproduktene. Resultatene tyder på at rep-PCR og RAPD typing kan være egnet for å påvise diversitet på stammenivå og smittekilder i denne type studie.

6 Konklusjon

Resultatene tyder på at det er ulikheter i bakterieflora mellom produksjonsmiljø. Det ble påvist lite bakterier fra produksjonsanlegg, spesielt før produksjonsstart (etter renhold). Det er derfor i større grad usikkert hvilke smittekilder som overførte bakterier til produktene.

Bakterienivå, bakterieflora og sensorisk bedømmelse av pålegg fra lagringsforsøk 1 viste at kjøttpålegg hadde generelt god kvalitet, til tross for at det var kvalitetsforskjeller mellom produkttypene. Disse resultatene kan tyde på at kjøttpålegg kunne hatt lengre holdbarhetsdato enn den som er oppgitt ved uåpnet tilstand, gitt at det ikke går på bekostning av mattrygghet. Den matbårne patogene *L. monocytogenes*, kan befinne seg i denne typen produkter og har evne til vekst, selv ved anbefalt kjølelagring. Tilstedeværelse av *L. monocytogenes* ble ikke testet i denne studien, men kan være en mattrygghetsutfordring for produkter som kjøttpålegg med lang holdbarhet som normalt ikke varmebehandles før konsum (Mattilsynet 2012). Resultatene tyder også på at forringelse skjedde raskere da produktene ble eksponert for oksygen, og ved høyere lagringstemperaturer (lagringsforsøk 2). Genotyping av identifiserte kolonier viste at det var stor variasjon innad i dominerende bakterieslekter påvist i produksjonsmiljø og i kjøttpålegg. Isolerte bakterier fra produksjonsmiljø og fra pålegg gir grunnlag for videre studier for å påvise sammenhenger mellom forringelse og egenskaper til bakterier.

7 Forslag til videre arbeid

- Bekrefte resultatene fra denne studien med flere gjentak
- Inkludere flere produsenter og flere typer kjøttpålegg
- Ta flere overflateprøver i produksjonsanleggene for å avdekke mulige smittekilder
- Plate ut flere fortynninger for å få større sikkerhet i resultatene
- Identifisere isolater til artsnivå for mer sikker identifisering
- Vurdere identifiserte bakterienes evne til forringelse i belastningsforsøk
- Kartlegge årsaker til ulikheter i bakteriesammensetning påvist i ulike produksjonsbatcher fra samme påleggstype
- Undersøke mulighetene for forlenget holdbarhetsdato på kjøttpålegg

8 Referanser

- Akhtar, S., Paredes-Sabja, D., Torres, J. A. & Sarker, M. R. (2009). Strategy to inactivate *Clostridium perfringens* spores in meat products. *Food Microbiol*, 26 (3): 272-7.
- Aymerich, T., Picouet, P. A. & Monfort, J. M. (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, 78 (1-2): 114-129.
- Baudart, J., Lemarchand, K., Brisabois, A. & Lebaron, P. (2000). Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (4): 1544-1552.
- Borch, E., Kant-Muermans, M. L. & Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int J Food Microbiol*, 33 (1): 103-20.
- Brul, S., Fratamico, P. M. & McMeekin, T. A. (2011). *Tracing pathogens in the food chain*. Woodhead Publishing series in food science, technology and nutrition,. Cambridge ; Philadelphia: Woodhead Pub. xxv, 610 p. s.
- Byrne, B., Lyng, J., Dunne, G. & Bolton, D. J. (2008). An assessment of the microbial quality of the air within a pork processing plant. *Food Control*, 19 (9): 915-920.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., *et al.* (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *Isme Journal*, 6 (8): 1621-1624.
- Cayre, M. E., Garro, O. & Vignolo, G. (2005). Effect of storage temperature and gas permeability of packaging film on the growth of lactic acid bacteria and *Brochothrix thermosphacta* in cooked meat emulsions. *Food Microbiology*, 22 (6): 505-512.
- Chasseignaux, E., Gerault, P., Toquin, M. T., Salvat, G., Colin, P. & Ermel, G. (2002). Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiol Lett*, 210 (2): 271-5.
- Chevallier, I., Ammor, S., Laguet, A., Labayle, S., Castanet, V., Dufour, E. & Talon, R. (2006). Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage. *Food Control*, 17 (6): 446-453.
- Costello, E. K., Lauber, C. L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J. I. & Knight, R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 326 (5960): 1694-7.
- Di Pinto, A., Novello, L., Montemurro, F., Bonerba, E. & Tantillo, G. (2010). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods from supermarkets in Southern Italy. *New Microbiol*, 33 (3): 249-52.
- Doulgeraki, A. I., Paramithiotis, S., Kagkli, D. M. & Nychas, G. J. (2010). Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Food Microbiol*, 27 (8): 1028-34.
- Egan, A. F. (1983). Lactic acid bacteria of meat and meat products. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49 (3): 327-336.
- Ercolini, D., Russo, F., Nasi, A., Ferranti, P. & Villani, F. (2009). Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. *Appl Environ Microbiol*, 75 (7): 1990-2001.
- Fatemi, P. & Frank, J. F. (1999). Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. *J Food Prot*, 62 (7): 761-5.
- Gilde. (u.å.-a). *E-nummer*. Gilde.no: Gilde. Tilgjengelig fra: <http://www.gilde.no/tilsetningsstoffer/e-nummer-article11083-10269.html> (lest 24.04.2014).

- Gilde. (u.å.-b). *Holdbarhet på åpnet kjøttpålegg*. Gilde.no: Gilde. Tilgjengelig fra: <http://www.gilde.no/ofte-stilte-spoersmaal/category13255.html?categoryID=13255#anchor11374> (lest 23.06.2014).
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B. & Givskov, M. (2002). Food spoilage--interactions between food spoilage bacteria. *Int J Food Microbiol*, 78 (1-2): 79-97.
- Hanssen, O. J. & Schakenda, V. (2011). Nyttbart matsvinn i Norge 2011 Analyser av status og utvikling i matsvinn i Norge 2010-11, OR.27.11 <http://ostfoldforskning.no>.
- Hanssen, O. J. & Møller, H. (2013). Matsvinn i Norge 2013 Status og utviklingstrekk 2009-2013 OR.32.13 <http://ostfoldforskning.no>.
- Hellstrom, S., Laukkanen, R., Siekkinen, K. M., Ranta, J., Maijala, R. & Korkeala, H. (2010). *Listeria monocytogenes* contamination in pork can originate from farms. *J Food Prot*, 73 (4): 641-8.
- Hoelzer, K., Moreno Switt, A. I. & Wiedmann, M. (2011). Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *Vet Res*, 42: 34.
- Høyem, T. (1996a). *Kjøtt og kjøtteknologi*: MATFORSK. 235, 75 s.
- Høyem, T. (1996b). *Kjøtt og kjøtteknologi*: MATFORSK. 235, 80 s.
- Høyem, T. (1996c). *Kjøtt og kjøtteknologi*: MATFORSK. 235, 69-74 s.
- Høyem, T. (1996d). *Kjøtt og kjøtteknologi*: MATFORSK. 235, 113-120 s.
- Ingham, S. C., Engel, R. A., Fanslau, M. A., Schoeller, E. L., Searls, G., Buege, D. R. & Zhu, J. (2005). Fate of *Staphylococcus aureus* on vacuum-packaged ready-to-eat meat products stored at 21 degrees C. *J Food Prot*, 68 (9): 1911-5.
- Ivanek, R., Grohn, Y. T. & Wiedmann, M. (2006). *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: review of available data for mathematical modeling. *Foodborne Pathog Dis*, 3 (4): 319-36.
- Joshi, M. & Deshpande, J. D. (2011). *POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION*. 2011, b. 2.
- Kaistha, N., Gupta, V., Sidhu, S. & Chander, J. (2011). *Salmonella-salmonellosis-rare presentations of a common pathogen*. *Asian Pac J Trop Med*, 4 (5): 417-20.
- Kruger, M., Shehata, A. A., Grosse-Herrenthey, A., Stander, N. & Schrod, W. (2014). Relationship between gastrointestinal dysbiosis and *Clostridium botulinum* in dairy cows. *Anaerobe*.
- Lovdata. *Forskrift om næringsmiddelhygiene*. lovdata.no. Tilgjengelig fra: http://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-12-22-1623#KAPITTEL_13 (lest 28.04).
- Lund, B. M., Baird-Parker, T. C. & Gould, G. W. (2000). *The microbiological safety and quality of food*. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers. 2024, 404-406 s.
- Lundqvist, J., de Fraiture, C. & Molden, D. (2008). Saving Water: From Field to Fork – Curbing Losses and Wastage in the Food Chain.
- Mattilsynet. (2004). *Hva er tilsetningsstoffer?* matportalen.no: Mattilsynet. Tilgjengelig fra: <http://www.matportalen.no/merking/tema/tilsetningsstoffer/#tabs-1-2-anchor>.
- Mattilsynet. (2008). *Kva er riktig temperatur i kjøleskapet?* Matportalen.no: Mattilsynet. Tilgjengelig fra: http://www.matportalen.no/matsmitte_og_hygiene/tema/kjokkenhygiene/kva_er_riktig_temperatur_i_kjoleskapet (lest 14.05.2014).
- Mattilsynet. (2011a). *E-nummer skulle gjøre det enklere for forbrukeren*. matportalen.no. Tilgjengelig fra: http://www.matportalen.no/merking/tema/tilsetningsstoffer/e-nummer_skulle_gjore_det_enklere_for_forbrukere (lest 24.04.2014).
- Mattilsynet. (2011b). *Hva betyr E-numerne?* matportalen.no: Mattilsynet. Tilgjengelig fra: <http://www.matportalen.no/artikler/article1408.ece/BINARY/Hva+betyr+e-numrene%3F>.

- Mattilsynet. (2012). *Listeria*. Mattilsynet.no: Mattilsynet. Tilgjengelig fra: http://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/smitte_fra_mat_og_drikke/bakterier_i_mat_og_drikke/listeria/ (lest 14.05.2014).
- Membre, J. M., Kubaczka, M., Dubois, J. & Chene, C. (2004). Temperature effect on *Listeria monocytogenes* growth in the event of contamination of cooked pork products. *J Food Prot*, 67 (3): 463-9.
- Mengesha, D., Zewde, B. M., Toquin, M. T., Kleer, J., Hildebrandt, G. & Gebreyes, W. A. (2009). Occurrence and distribution of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in ready-to-eat and raw meat products. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 122 (1-2): 20-4.
- Murcia, M. A., Martinez-Tome, M., Nicolas, M. C. & Vera, A. M. (2003). Extending the shelf-life and proximate composition stability of ready to eat foods in vacuum or modified atmosphere packaging. *Food Microbiology*, 20 (6): 671-679.
- Nychas, G. J., Skandamis, P. N., Tassou, C. C. & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Sci*, 78 (1-2): 77-89.
- Ovca, A. & Jevšnik, M. (2009). Maintaining a cold chain from purchase to the home and at home: Consumer opinions. *Food Control*, 20 (2): 167-172.
- Papadopolou, O. S., Doulgeraki, A. I., Botta, C., Cocolin, L. & Nychas, G. J. (2012). Genotypic characterization of *Brochothrix thermosphacta* isolated during storage of minced pork under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Meat Sci*, 92 (4): 735-8.
- Pennacchia, C., Ercolini, D. & Villani, F. (2011). Spoilage-related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack. *Food Microbiol*, 28 (1): 84-93.
- Quintavalla, S. & Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 62 (3): 373-380.
- Saltmarsh, M. (2013). *Essential Guide to Food Additives*. 4 utg.: RSC Publishing.
- Samelis, J., Kakouri, A., Georgiadou, K. G. & Metaxopoulos, J. (1998). Evaluation of the extent and type of bacterial contamination at different stages of processing of cooked ham. *Journal of Applied Microbiology*, 84 (4): 649-660.
- Stasiewicz, M. J., Wiedmann, M. & Bergholz, T. M. (2011). The transcriptional response of *Listeria monocytogenes* during adaptation to growth on lactate and diacetate includes synergistic changes that increase fermentative acetoin production. *Appl Environ Microbiol*, 77 (15): 5294-306.
- Thevenot, D., Dernburg, A. & Vernozy-Rozand, C. (2006). An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *J Appl Microbiol*, 101 (1): 7-17.
- van Overbeek, L. S., van Doorn, J., Wichers, J. H., van Amerongen, A., van Roermund, H. J. & Willemsen, P. T. (2014). The arable ecosystem as battleground for emergence of new human pathogens. *Front Microbiol*, 5: 104.
- Vasilopoulos, C., De Maere, H., De Mey, E., Paelinck, H., De Vuyst, L. & Leroy, F. (2010). Technology-induced selection towards the spoilage microbiota of artisan-type cooked ham packed under modified atmosphere. *Food Microbiol*, 27 (1): 77-84.
- Xu, Y., Anyogu, A., Ouoba, L. I. & Sutherland, J. P. (2010). Genotypic characterization of *Brochothrix* spp. isolated from meat, poultry and fish. *Lett Appl Microbiol*, 51 (3): 245-51.
- Yang, J. L., Wang, M. S., Cheng, A. C., Pan, K. C., Li, C. F. & Deng, S. X. (2008). A simple and rapid method for extracting bacterial DNA from intestinal microflora for ERIC-PCR detection. *World J Gastroenterol*, 14 (18): 2872-6.

9 Vedlegg

Vedlegg 1: Medier og løsninger

Vedlegg 2: Bakterienivå i kjøttpålegg

Vedlegg 3: Rådata fra sensoriske bedømmelser av kjøtpålegg

Vedlegg 1: Medier og løsninger

deMan, Rogosa and Sharpe agar (MRS)

49,6 g MRS (Oxoid, Hampshire, England) ble løst i 800 ml. Milli-Q vann og autoklavert i 15 minutter ved 115° C. Løsningen ble nedkjølt til omtrent 45° C på vannbad før den ble fordelt i petriskåler. Etter avkjøling ved romtemperatur ble skålene oppbevart ved 4°C i lukket plastpose.

deMan, Rogosa and Sharpe broth (MRS-buljong)

41,6 g. MRS broth (Oxoid, Hampshire, England) ble løst i ble løst i 800 ml Milli-Q vann og autoklavert i 15 minutter ved 121° C. Løsningen ble oppbevart i romtemperatur.

Plate count agar (PCA)

18,8 g PCA (Oxoid, Hampshire, England) ble løst i 800 ml Milli-Q vann og autoklavert i 15 minutter ved 121° C. Løsningen ble nedkjølt til omtrent 45° C på vannbad før den ble fordelt i petriskåler. Etter avkjøling ved romtemperatur ble skålene oppbevart ved 4°C i lukket plastpose.

Nutrient Broth (NB)

10,4 g. NB (Oxoid, Hampshire, England) ble løst i ble løst i 800 ml Milli-Q vann og autoklavert i 15 minutter ved 121° C. Løsningen ble oppbevart i romtemperatur.

Peptonvann

1 g. BactoTM peptone (Oxoid) og 8,5 g. NaCl (Mereck) ble løst i 4 liter Milli-Q vann og pH ble endret til 7,2. Peptonvannet ble autoklavert ved 121° C i 15 min.

Vedlegg 2: Bakterienivå i kjøttpålegg

Bakterienivå (log CFU/g) i pålegg fra lagringsforsøk 1 og 2.

Tabell Vedlegg 2 a Bakterienivå (log CFU/g) i servelat (lagringsforsøk 1).

Servelat				
Uttak	MRS aerobt	MRS anaerobt	PCA aerobt	PCA anaerobt
Utløpsdato (A1)	<5,00**	<5,00	<5,00	<5,00
Utløpsdato (A2/ misfarget)	8,43*	9,21*	8,54	8,23*
1 uke over utløpsdato	8,65	8,51	8,64	8,62
14 dager over utløpsdato	8,30*	8,12*	9,21*	8,46*
27 dager over utløpsdato	7,28	7,35	7,45	7,33

*Under 30 kolonier

** Under deteksjonsgrensen (<log 5 CFU/g)

Tabell Vedlegg 2 b Bakterienivå (log CFU/g) i røkt skinke (lagringsforsøk 1).

Røkt skinke				
Uttak	MRS aerobt	MRS anaerobt	PCA aerobt	PCA anaerobt
Utløpsdato	8,35	7,62	7,64*	7,80*
1 uke over utløpsdato	7,39	7,23	7,73*	7,94*
17 dager over utløpsdato	7,76*	7,75*	7,70*	8,11*

*Under 30 kolonier

Tabell Vedlegg 2 c Bakterienivå (log CFU/g) i kyllingpålegg (lagringsforsøk 1).

Kyllingpålegg				
Uttak	MRS aerobt	MRS anaerobt	PCA aerobt	PCA anaerobt
Utløpsdato	7,88*	8,28*	8,74*	7,85*
1 uke over utløpsdato	8,08*	7,34	8,15*	8,15*
26 dager over utløpsdato	8,20*	8,48	8,26*	8,30*

*Under 30 kolonier

Tabell Vedlegg 2 d Bakterienivå (log CFU/g) i kokt skinke (lagringsforsøk 1).

Kokt skinke				
Uttak	MRS aerobt	MRS anaerobt	PCA aerobt	PCA anaerobt
Utløpsdato	<5,00**	<5,00	<5,00	<5,00
1 uke over utløpsdato	<5,00	<5,00	5,00*	7,00*
38 dager over utløpsdato	<5,00	5,48*	<5,00	5,48*

*Under 30 kolonier

** Under deteksjonsgrensen (<log 5 CFU/g)

Tabell Vedlegg 2 e Bakterienivå (log CFU/g) i pepperskinke (lagringsforsøk 1).

Pepperskinke				
Uttak	MRS aerobt	MRS anaerobt	PCA aerobt	PCA anaerobt
Utløpsdato	8,51*	8,55	8,57	8,67
1 uke over utløpsdato	8,54	8,47*	8,30*	8,51*
17 dager over utløpsdato	10,61	10,86	8,51	8,36*
23 dager over utløpsdato	8,31	8,51	8,78*	8,66

*Under 30 kolonier

Tabell Vedlegg 2 f Bakterienivå (log CFU/g) i hel pepperskinke (lagringsforsøk 1).

Hel pepperskinke					
Uttak	Prøve	MRS aerobt	MRS anaerobt	PCA aerobt	PCA anaerobt
Utløpsdato	A (overflate)	<2,00**	<2,00	5,05*	4,85*
	B (overflate)	<2,00	<2,00	4,06	4,28
	C (kjerne)	<2,00	<2,00	4,53*	4,33
	V(væske)	<1,00	<1,00	4,09	<1,00

* Under 30 kolonier

** Under deteksjonsgrensen (<log 5 CFU/g)

Tabell Vedlegg 2 g Bakterienivå (log CFU/g) i kyllingpållegg (lagringsforsøk 2).

Kyllingpållegg				
Uttakstid	Lagringstemperatur	Åpnet før mikrobiologisk uttak	MRS	PCA
2 uker før utløpsdato	4°C	-	5,71*	5,82*
Utløpsdato	4°C	+	8,58	8,64
Utløpsdato	4°C	-	8,28	8,48
Utløpsdato	4°C/25°C ^x	+	8,37	7,88
1 uke over utløpsdato	4°C	+	8,36	8,55
1 uke over utløpsdato	4°C/25°C ^x	+	8,51	8,77
Utløpsdato	8°C	+	8,45	8,74
Utløpsdato	8°C	-	6,88	7,23
Utløpsdato	8°C/25°C ^x	+	8,65	8,68
1 uke over utløpsdato	8°C	+	8,88	8,64
1 uke over utløpsdato	8°C/25°C ^x	+	8,57	8,97
1 uke over utløpsdato	8°C	-	7,53	7,55

* Under 30 kolonier på skål

^x lagret ved angitt lagringstemperatur og inkubert ved 25°C to timer daglig fra åpning til uttak

Tabell Vedlegg 2 h Bakterienivå (log CFU/g) i pepperskinke (lagringsforsøk 2).

Pepperskinke				
Uttak	Lagringstemperatur	Åpnet før mikrobiologisk uttak	MRS	PCA
2 uker før utløpsdato	4°C	-	8,59	8,53
Utløpsdato	4°C	+	8,38	8,27
Utløpsdato	4°C	-	8,52	8,49
Utløpsdato	4°C/25 ^x	+	7,82 [*]	8,59
Utløpsdato	8°C	+	5,64	8,40
Utløpsdato	8°C	-	8,49	8,71
Utløpsdato	8°C/25°C ^x	+	8,64	8,37
1 uke over utløpsdato	8°C	-	8,71	8,51

* Under 30 kolonier på skål

^x lagret ved angitt lagringstemperatur og inkubert ved 25°C to timer daglig fra åpning til uttak

Tabell Vedlegg 2 i Bakterienivå (log CFU/g) i kokt skinke (lagringsforsøk 2).

Kokt skinke				
Uttakstid	Lagringstemperatur	Åpnet før mikrobiologisk uttak	MRS	PCA
2 uker før utløpsdato	4°C	-	5,00 [*]	4,73 [*]
Utløpsdato	4°C	+	5,58 [*]	5,66 [*]
Utløpsdato	4°C	-	3,48 [*]	3,78 [*]
Utløpsdato	4°C/25°C ^x	+	5,99	6,20
1 uke over utløpsdato	4°C	+	7,28	7,34
1 uke over utløpsdato	4°C/25°C ^x	+	7,93	7,81
Utløpsdato	8°C	+	6,45	6,46
Utløpsdato	8°C	-	6,59	6,76
Utløpsdato	8°C/25°C ^x	+	7,54	7,55 [*]
1 uke over utløpsdato	8°C	+	6,13	6,05
1 uke over utløpsdato	8°C/25°C ^x	+	7,51	>5,48 ^{**}
1 uke over utløpsdato	8°C	-	5,27	5,24

* Under 30 kolonier på skål

** Over deteksjonsverdi

^x lagret ved angitt lagringstemperatur og inkubert ved 25°C to timer daglig fra åpning til uttak

Vedlegg 3: Rådata fra sensoriske bedømmelser av kjøttpålegg

Tabell Vedlegg 3 a Sensorisk bedømmelse (lukt) av pepperskine fra butikk (lagringsforsøk 1)

Dommer	Kode	Produkt: Pepperskinke	Svinekjøtt	Fermentert sur	Metall	Pepper	Fjøs	Syrlig	Fjøs (hvitpepper)	Kjemikalier	Søt	Kjøtt	Kjøleskap	Kommentarer, lukt
103	183	Lagret 15C, 2uker	5,1	2,6	4,4	4,7	3,9							
102	183	Lagret 15C, 2uker		2,4		2,1		1,0	3,0					Jevn overflate/farge, gass
110	183	Lagret 15C, 2uker			3,7				4,4	3,4		3,0		Kvalmende lukt, emmen
103	221	Over holdbarhetsdato	5,0	5,1	4,6	4,6	4,1						3,4	
102	221	Over holdbarhetsdato		8,6		2,1		1,0						Stor fargeforskjell røde og hvitere felt
110	221	Over holdbarhetsdato						4,6	5,6	1,9	3,3	4,0		
103	239	Ved utløpsdato	5,2	1,8	4,7	4,9	4,2							Hvit pepper lukter fjøs
102	239	Ved utløpsdato			4,3	3,8	4,5	2,8						fermentert
110	239	Ved utløpsdato			4,0			4,7	3,9		3,3	4,5		
103	433	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, fryst	4,5		4,5	5,2	4,2						3,5	
102	433	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, fryst			5,2	7,3	3,3	5,6						Lysere og mørkere felter
110	433	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, fryst			5,0			3,3	4,3	2,5	3,0	3,7		Kvalmende lukt
103	587	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, ikke fryst	4,1		4,5	4,7	4,0						3,6	
102	587	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, ikke fryst				3,4		3,3						Råtten appelsin (ellers fra rommet?) Svakere lukt
110	587	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, ikke fryst			4,2			5,5	2,9		3,5	4,9		
103	967	En uke over utløpsdato	5,5	2,7	4,2	4,5	3,7							Hvit pepper = fjøslukt
102	967	En uke over utløpsdato		3,0	3,1	2,9	3,4	1,6						Svakere lukt
110	967	En uke over utløpsdato			4,2			3,0	3,9	2,8	3,5	3,5		

Tabell Vedlegg 3 b Sensorisk bedømmelse (lukt) av pepperskinke fra produsent fra lagringsforsøk 1.

Kode	Produkt: pepperskinke	Syrlig	Metall	Kjøtt	Fermentert(sur)	Søt	Fjøs	Kjøleskap	Emmen	Krydder	Pepper sort	Kommentarer
129	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, ikke fryst REF	4,80	3,90	2,80	1,00	2,50	5,60	1,00	1,4			Lukter veldig fjøs pga hvit pepper
129	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, ikke fryst REF	4,80	2,80	2,80	1,00	2,30	1,10	1,00		5		
129	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, ikke fryst REF	1,00	5,60	6,20	1,00	1,00	4,20	2,60			x	
350	Over holdbarhetsdato	3,90	4,50	3,10	1,00	3,70	6,10	1,00	3,1			Fjøs pga hvit pepper
350	Over holdbarhetsdato	1,00	4,80	3,40	2,25	2,25	5,60	1,00		3,4		
350	Over holdbarhetsdato	1,00	6,10	6,10	2,25	1,00	5,60	1,60				Fjøs hvit pepper
486	En uke over utløpsdato	2,80	3,60	3,10	2,60	3,90	5,00	1,00	3,4			Cecculose, treverk
486	En uke over utløpsdato	1,50	4,30	4,00	1,00	1,00	4,10	1,00		3,3		
486	En uke over utløpsdato	1,10	5,60	6,20	1,00	1,00	2,50	2,50				
553	Ved utløpsdato	2,20	4,00	2,80	3,40	3,10	5,10	1,00	2,8			Fjøs pga av hvit pepper, cellulose, treverk
553	Ved utløpsdato	1,90	4,20	4,30	1,00	1,60	2,80	1,00		4,2		
553	Ved utløpsdato	1,00	5,60	5,60	1,80	1,00	3,10	2,50				
627	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, fryst	5,60	5,00	5,10	1,00	1,70	4,50	1,00				Fjøs pga hvit pepper
627	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, fryst	5,60	2,80	3,90	1,00	3,40	1,10	1,00		3,6		Litt blomsteraktig søt lukt
627	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, fryst	1,30	5,60	6,75	1,00	1,00	2,25	1,30			x	
942	Lagret 15C, 2 uker	4,00	5,00	4,50	1,00	3,40	5,60	1,00	2,5			Fjøs pga hvit pepper
942	Lagret 15C, 2 uker	1,90	4,50	4,20	1,00	3,10	5,50	1,00		2,7		Råne lukt
942	Lagret 15C, 2 uker	1,10	5,40	6,10	1,00	1,00	2,80	2,10				

Tabell Vedlegg 3 c Sensorisk bedømmelse (lukt) av servelat fra lagringsforsøk 1.

Dommer	Kode	Produkt: Servelat	Svinekjøtt	Krydder	Fermentert (sur)	Syrlig	Kjøleskap	Metall	Fett	Søt	Eddik	Krydder	Røkt	Kommentarer, lukt
103	156	En uke over utløpsdato	5,4	4		4,5	1,5	3,5						
102	156	En uke over utløpsdato	5,4			5,55		5,2	3,7			2,5		
110	156	En uke over utløpsdato	3,8							3	4,4	3,3	5,4	muskat
103	303	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, ikke fryst	4,4	2		2	2,9	3,7						
102	303	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, ikke fryst	3,8			4,7		4,4	3,4			2,9	3	
110	303	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, ikke fryst	3,5	5,5	2,6					4			4,5	muskat, medister
102	383	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, fryst				4,4		6	3,5			1,6	4	
103	383	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, fryst	5,6	4,1		2,7		3,3						Kjøleskap
110	383	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, fryst	3,5	3,4									3,4	plast, høy, gress
103	395	27 dager over utløpsdato	5,6	3,6		2	1,4	3,6						
102	395	27 dager over utløpsdato	2	2,3		6		5	2,9			2,1		Muskat, pepper, lever
110	395	27 dager over utløpsdato				4,7				4		2,5	3,2	Kjøleskap, muskat, lav intensitet lukt, krydderprikker
103	455	Over holdbarhetsdato	5	2,5		2,3		3						Kjøleskap
102	455	Over holdbarhetsdato		3		2,9		4,1					3,6	Lite fuktig felt på overflaten svakere lukt
110	455	Over holdbarhetsdato	3,3			5,8				4		3,8	4,4	
103	482	Ved utløpsdato	5,4	1,8		3,3	1,8	3,7						
102	482	Ved utløpsdato				2,4		3,8	4				3,8	
110	482	Ved utløpsdato	4,1	3		4,9					2,3		3,2	sennep
103	844	14 dager over utløpsdato	2,9	1,8		2	1,9	4,2						
102	844	14 dager over utløpsdato			8,4	1		3,6						Råtten, Vått fuktig fett felt på midten
110	844	14 dager over utløpsdato	3,8							3	3,3	4,4	5,4	plast, sennep
103	956	Lagret 15C, 2 uker	1,5	1,5	6,5	5	4,3	3,7						
102	956	Lagret 15C, 2 uker	5,3		7,2	1		3,7						Kjemikalie, Våt/svett på midten
110	956	Lagret 15C, 2 uker						4,8				5	2,1	Kvalmende lukt, brunst, involler, emmen

Tabell Vedlegg 3 d Sensorisk bedømmelse (lukt) av kyllingpålegg fra lagringsforsøk 1.

Dommer	Kode	Produkt: Kyllingfilet	Metall	Syrlig	Kjøleskap	Emmen, søt	Eddik	Røkt, sot, kjære	Fermentert, sur	Kjøtt	Kjemikalie	Kommentarer, lukt
103	852	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, ikke fryst	4,5	1,1								For, Emmen, ufrisk (kyllingfjøs), kaldlukt
102	852	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, ikke fryst	5,45	1				4,9		3,9		Ujevn farge/hvithet ser slapp og innsunken ut blass tørr gulaktig felt, kattetiss
110	852	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, ikke fryst										Urin, Våt hund (brunst)
103	422	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, fryst	4,2	1,1	3,3							Suraktig svinekjøtt
102	422	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, fryst	4,7					3,9				Saltlake, blod, kattetiss
110	422	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, fryst		5		3,3				4,5		
103	654	Ved utløpsdato	4,4		3,3							Suraktig svinekjøttaktig lukt
102	654	Ved utløpsdato	6,1	2	6,3	6,7			4,4	1		Blod, Brød skorpe, mye vann på overflaten, blass , papp
110	654	Ved utløpsdato				4,9	3,5				3,9	Fermentert lukt
103	218	En uke over utløpsdato	4,1	2,5	4,2							(Kyllingaktig lukt)
102	218	En uke over utløpsdato							3,8			Svak lukt vått område, papp
110	218	En uke over utløpsdato	5,2			4	3,6				2,8	
102	706	Over holdbarhetsdato	5,6	1				5,4			7	Tørr innsunken/klumpete overflate blek
103	706	Over holdbarhetsdato	4	1	3,6							Fermentert, sur
110	706	Over holdbarhetsdato				4,7	3,2				2,8	Fermentert lukt
103	399	Lagret 15C, 2 uker	4,35	1,1	2,9							Lukter som skinke på boks (picnic). Kald lukt, emmen lukt
102	399	Lagret 15C, 2 uker	4,3					4,7	4,6			Saltlake, Mørkere felt, mange sprekker brødskorpe lukt
110	399	Lagret 15C, 2 uker				4,7	2,8			3	3,7	Kvalmende lukt, fermentert

Tabell Vedlegg 3 e Sensorisk bedømmelse (lukt) av røkt skinke fra lagringsforsøk 1.

Dommer	Produkt: bøketøkt skinke	Syrlig	Metall	Kjøtt	Fermentert (sur)	Søt	Fjøs	Kjøleskap	Røyk	Emmen	Gjær	Lake lukt	Kommentarer
107	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, fryst	5,60	5,30	5,90	1,00	2,50	1,00	1,00	3,40				
107	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, fryst	3,70	3,30	4,50	1,00	2,50	1,00	1,00	5,00				Lukter som bacon
107	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, fryst	1,60	5,00	3,80	1,00	1,00	1,00	1,60					Lukter røkt
310	Over holdbarhetsdato	2,00	3,90	2,70	3,00	3,40	1,00	1,00	2,80	3,30			Gjærdukt
310	Over holdbarhetsdato	1,00	3,70	3,60	1,50	1,60	1,00	1,00			4,80		
310	Over holdbarhetsdato	1,10	5,30	5,80	1,00	1,10	1,00	3,40					
576	Ved utløpsdato	1,90	5,30	2,50	2,80	2,25	3,40	1,00	2,80				Urinlukt
576	Ved utløpsdato	2,25	5,00	4,50	1,10	1,80	1,00	1,00				5,80	Litt suraktig lakelukt Lukter mye svin
576	Ved utløpsdato	1,40	5,40	6,50	1,00	1,00	1,00	3,00					
758	En uke over utløpsdato	4,20	5,50	4,70	1,00	2,25	1,90	1,00	1,70				
758	En uke over utløpsdato	1,10	2,80	3,40	1,00	1,60	1,00	1,00	2,60		4,30		
758	En uke over utløpsdato	1,10	4,40	5,00	1,00	1,00	1,00	2,50					
873	Lagret 15C, 2 uker	2,50	4,00	3,40	2,80	4,30	2,60	1,00	2,50	4,00			
873	Lagret 15C, 2 uker	1,10	4,30	3,60	2,25	1,20	1,00	2,60	1,70				
873	Lagret 15C, 2 uker	1,00	5,30	1,40	4,70	2,20	1,00	2,10					
971	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, ikke fryst REF	5,40	4,00	4,80	1,00	2,20	1,00	1,00	4,00				
971	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, ikke fryst REF	4,20	3,70	3,30	1,00	3,00	1,00	1,00	4,30				
971	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, ikke fryst REF	4,00	4,50	4,20	1,00	1,00	1,00	1,10					Lukter røkt

Tabell Vedlegg 3 f Sensorisk bedømmelse (lukt) av kokt skinke fra lagringsforsøk 1.

Kode	Produkt: kokt skinke	Syrlig	Metall	Kjøtt	Fermentert, sur	Søt	Fjøs	Kjøleskap	Emmen	Kommentarer
328	Over holdbarhetsdato	4,20	6,40	4,50	1,00	2,70	4,40	1,00	3,70	Cellulose, treverk
328	Over holdbarhetsdato	1,10	2,80	3,70	1,00	2,10	1,10	1,00		Lukter kattetiss og svette, stra, lukt
328	Over holdbarhetsdato	1,10	5,60	5,60	1,00	1,00	1,00	3,10		
369	En uke over utløpsdato	1,90	5,30	2,70	4,20	3,40	1,00	2,80	3,60	Medister
369	En uke over utløpsdato	2,30	4,80	3,70	1,00	1,90	2,80	1,10		Litt kattetissluk
369	En uke over utløpsdato	1,10	6,50	5,90	1,10	1,00	1,00	1,90		
417	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, ikke fryst REF	4,20	6,40	5,30	1,00	2,30	3,10	1,00		
417	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, ikke fryst REF	1,90	4,80	4,60	1,00	1,10	3,30	1,00		Lukter litt som leverpostei/svin
417	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, ikke fryst REF	1,60	5,30	6,20	1,00	1,00	1,00	1,70		
518	Lagret 15C, 2 uker	2,50	5,70	3,70	3,40	3,70	4,30	1,00	4,80	Cellulose, treverk, svovel
518	Lagret 15C, 2 uker	1,40	5,20	3,70	3,00	2,60	1,10	1,10		
518	Lagret 15C, 2 uker	1,10	5,30	5,80	1,00	1,00	1,00	2,80		
622	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, fryst	4,00	6,20	3,10	2,70	3,40	3,10	1,00	2,25	Cellulose, treverk
622	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, fryst	4,30	3,60	4,80	1,00	2,10	1,10	1,00		Tenker på aspik/gele
622	Nyinkjøpt pålegg, god kvalitet, fryst	1,00	5,60	5,60	2,30	1,00	1,00	2,30		
942	Ved utløpsdato	3,50	4,70	4,50	1,00	2,80	1,90	1,00		
942	Ved utløpsdato	1,00	5,00	3,60	1,00	1,90	3,70	1,00		Lukter litt som kattetiss
942	Ved utløpsdato	1,30	6,10	5,80	1,00	1,00	1,00	3,10		

Tabell Vedlegg 3 g Sensorisk bedømmelse (lukt) av kokt skinke fra lagringsforsøk 2.

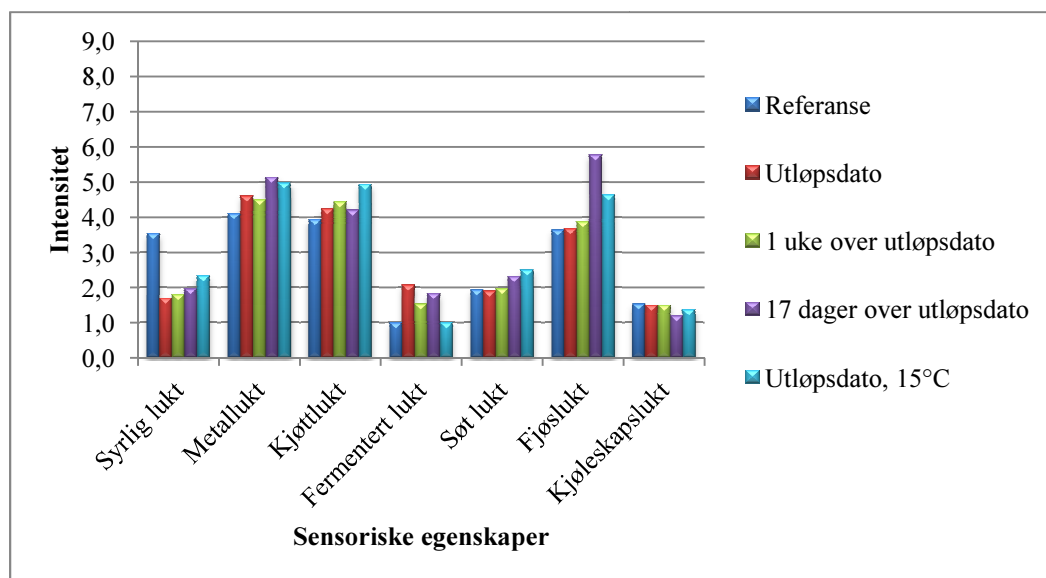
Produkt	Lagringstemp	Produkt: kokt skinke	Syrlig lukt	Søt lukt	Metallukt	Kjøttlukt	Fermentert (sur)	Fjøsukt	Kjøleskalpslukt	Emmen lukt
KOP1	8°C	Lagret uåpnet til utl. Dato. Uttak på utl.dato	2,7	3,2	6,4	4,8	2,3	3,0	4,6	3,5
KOP3G	8°C	En skive. Pakken er åpnet 2 uker f/ utl.dato. Uttak på utl.dato.	1,0	4,0	3,5	3,8	7,9	2,3	3,1	8,2
KOP4G	8°C	En skive. Pakken er åpnet 2 uker f/ utl.dato. Uttak på utl.dato. Inkubert på 25 °C daglig i to timer.	1,0	3,6	3,3	3,5	6,2	2,1	3,5	5,7
KOP5	4°C	Lagret uåpnet til utl. Dato. Uttak på utl.dato	4,4	3,8	5,2	5,7	1,0	2,1	3,3	2,3
KO P6G	4°C	En skive. Pakken er åpnet 2 uker f/ utl.dato. Uttak på utl.dato.	3,4	3,4	5,9	5,5	1,1	2,6	3,4	3,0
KOP7G	4°C	En skive. Pakken er åpnet 2 uker f/ utl.dato. Uttak på utl.dato. Inkubert på 25 °C daglig i to timer.	2,9	3,4	5,7	4,7	1,8	2,7	5,1	4,2

Tabell Vedlegg 3 h Sensorisk bedømmelse (lukt) av pepperskinke fra lagringsforsøk 2.

Produkt	Lagringstemp	Produkt: pepperskinke	Syrlig lukt	Søt lukt	Metallukt	Kjøttlukt	Fermentert (sur)	Fjøsukt	Kjøleskalpslukt	Emmen lukt
P81	8°C	Lagret uåpnet til utl. Dato. Uttak på utl.dato	3,2	3,4	4,3	4,4	1,3	4,1	3,5	2,9
P83G	8°C	En skive. Pakken er åpnet 2 uker f/ utl.dato. Uttak på utl.dato.	1,0	3,3	5,3	2,7	6,0	3,2	4,3	6,4
P84G	8°C	En skive. Pakken er åpnet 2 uker f/ utl.dato. Uttak på utl.dato. Inkubert på 25 °C daglig i to timer.	1,8	2,9	4,7	2,0	6,7	4,1	3,8	7,0
P41	4°C	Lagret uåpnet til utl. Dato. Uttak på utl.dato	4,0	3,3	5,3	5,9	1,3	3,3	2,9	3,5
P42G	4°C	En skive. Pakken er åpnet 2 uker f/ utl.dato. Uttak på utl.dato.	2,7	3,0	4,3	3,7	2,2	4,4	3,9	4,1
P43G	4°C	En skive. Pakken er åpnet 2 uker f/ utl.dato. Uttak på utl.dato. Inkubert på 25 °C daglig i to timer.	1,2	3,5	4,3	2,9	5,3	4,5	4,3	5,1

Tabell Vedlegg 3 i Sensorisk bedømmelse (lukt) av kyllingpållegg fra lagringsforsøk 2.

Kode	Lagringstemp	Produkt: kyllingfilet naturell	Syrlig lukt	Søt lukt	Metallukt	Kjøttlukt	Fermentert (sur)	Fjølslukt	Kjøleskalpslukt	Emmen lukt
KYP1	8°C	Lagret uåpnet til utl. Dato. Uttak på utl.dato	2,5	3,0	4,1	4,1	2,4	2,5	2,8	3,8
KYP3G	8°C	En skive. Pakken er åpnet 2 uker f/ utl.dato. Uttak på utl.dato.	1,0	3,6	4,8	1,9	8,3	2,4	3,1	9,0
KYP4G	8°C	En skive. Pakken er åpnet 2 uker f/ utl.dato. Uttak på utl.dato. Inkubert på 25 °C daglig i to timer.	1,0	3,5	3,8	1,3	9,0	2,4	4,1	8,9
KYP6	4°C	Lagret uåpnet til utl. Dato. Uttak på utl.dato	3,1	2,8	4,4	4,2	2,2	1,7	3,3	3,1
KYP6G	4°C	En skive. Pakken er åpnet 2 uker f/ utl.dato. Uttak på utl.dato.	1,5	3,3	4,7	3,2	4,2	2,9	3,9	4,3
KYP7G	4°C	En skive. Pakken er åpnet 2 uker f/ utl.dato. Uttak på utl.dato. Inkubert på 25 °C daglig i to timer.	1,0	4,3	4,5	1,2	7,6	2,0	4,2	7,4



Figur Vedlegg 3 a Sensorisk bedømmelse av pepperskinke fra produksjonsanlegg ved ulike lagringstider.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no