



Lunds tekniska högskola
Institutionen för processteknik och tillämpad
biovetenskap
YTHL05, Kandidatarbete i Livsmedelsteknik
15 högskolepoäng, G2 (Grundnivå, fördjupad)
Kursansvarig: Ia Rosenlind

Studie om mikrobiologisk säkerhet i kallpaketerad fisk inom kommunal måltidsdistribution

Författare: Petter Siljedahl och Malin Persson

Handledare: Ia Rosenlind och Olena Prykhodko

Examinator: Åsa Håkansson

Abstract

The study explores the microbiological quality of saithe fillets cooked to an internal temperature of 72°C and subsequently cold-packaged under both modified and unmodified atmospheres. Through collaboration with a municipality, knowledge exchange has been facilitated, potentially identifying areas for future development within the subject area. The purpose of this study is to investigate how different packaging methods and storage times affect the microbiological quality of fish, with a focus on mesophilic aerobic microorganisms and coliform indicator bacteria within the *Enterobacteriaceae* family. In addition to the experimental investigation, an extensive literature review has been conducted to compare and relate our findings to previous research in the field.

The main findings of the study indicate that at an internal temperature of 72°C, no identifiable growth of mesophilic aerobic microorganisms or coliform indicator bacteria occurs based on the method used. Furthermore, no correlation between microbiological activity and decreased pH value was observed. However, a possible correlation between increasing pH value over time and microbiological activity was noted, suggesting a potential need for further investigation. Despite microbiological activity being unidentifiable within our limitations, sensory observations revealed that the fish was not palatable, which is of significant importance. The conclusion drawn is that the fish is likely to be considered microbiologically safe at an internal temperature of 72°C, but further specific microbiological sampling should be conducted to ensure safety, and despite likely safety, this internal temperature is not optimal from a sensory perspective. Furthermore, the study provided insight into opportunities for development regarding communication and routines with the collaborative partner to ensure that produced food holds a quality level from both safety and sensory perspective.

Sammanfattning

I studien utforskas den mikrobiologiska kvaliteten hos sejfiléer som tillagas till 72°C i innertemperatur och sedan kallpaketeras under både modifierad och icke-modifierad atmosfär. Genom ett samarbete med en kommun har vi kunnat utbyta kunskap och eventuellt identifiera områden för framtida utveckling inom ämnet. Syftet med denna studie är att undersöka hur olika förpackningsmetoder och lagringstider påverkar den mikrobiologiska kvaliteten hos fisk, med fokus på mesofila aeroba mikroorganismer och koliforma indikatorbakterier inom familjen *Enterobacteriaceae*. Utöver den mikrobiella undersökningen har en omfattande litteraturstudie genomförts för att jämföra och relatera våra resultat till tidigare forskning inom området.

Huvudresultaten av studien visar att vid en innertemperatur på 72°C sker ingen identifierbar tillväxt av mesofila aeroba mikroorganismer eller koliforma indikatorbakterier utifrån den använda metoden. Vi kunde inte heller observera någon korrelation mellan mikrobiologisk aktivitet och sänkt pH-värde. Däremot noterades en möjlig korrelation mellan ökande pH-värde över tid och mikrobiologisk aktivitet, vilket indikerar ett potentiellt behov av ytterligare undersökningar. Trots att mikrobiologisk aktivitet var oidentifierbar enligt våra avgränsningar visade sensoriska observationer att fisken inte var aptitretande, vilket är av stor betydelse. Slutsatsen är att fisken troligen kan betraktas som mikrobiologiskt säker vid en innertemperatur på 72°C men att ytterligare specifika mikrobiologiska provtagningar bör göras för att säkerställa säkerheten, samt att trots trolig säkerhet så är denna innertemperatur inte optimalt ur en sensorisk synvinkel. Vidare gav studien insikt i att det finns utvecklingsmöjligheter gällande kommunikation och rutiner hos samarbetspartnern för att säkerställa en standardiserad arbetsgång samt en kvalitet på producerade maträtter ur perspektiven, säkerhet och sensorisk upplevelse.

Nyckelord

Fisk, havet, kemiska processer i fisk, mikrobiologisk aktivitet, mikroorganismer, näringsinnehåll, kallpaketerade maträtter, transport, lagring, modifierad atmosfär, icke modifierad atmosfär, vakuum, luft.

Förord

Detta examensarbete har skrivits av Malin Persson och Petter Siljedahl och grundar sig i ett intresse för mikrobiologi inom livsmedel. Under en praktik inom den omnämnda kommunen höstterminen 2024 väcktes en frågeställning kring hur länge tillagad och paketerad fisk faktiskt håller, utifrån ett livsmedelssäkert perspektiv. En fråga som många inom livsmedelsbranschen funderar kring och faktiskt inte riktigt vet svaret på. Frågeställningen omarbetades och blev en vetenskaplig fråga vilket resulterade i att färdiglagad och kallpaketerad fisk blev huvudämnet för denna studie, och därefter drog arbetet igång våren 2024.

Vi vill tacka den omnämnda kommunen för att vi fick ta del av rutiner och material inom deras måltidsdistribution samt att vi fick äran att nyttja kommunens lokaler och expertis under arbetets gång. Ett stort tack till våra handledare Ia Rosenlind och Olena Prykhodko för all hjälp och till sist vill vi även tacka vår examinator Åsa Håkansson.

Malin Persson

Petter “*Biceps*” Siljedahl

[2024-05-08]

Innehållsförteckning

Abstract	1
Sammanfattning	2
Nyckelord	2
Förord	3
1. Inledning	6
1.1 Syfte.....	7
1.1.1 Problemformulering.....	8
1.2 Hypotes.....	8
1.3 Avgränsningar.....	9
2. Teoretisk bakgrund	10
2.1 Positiva aspekter med fisk; kulturell, näringsmässig och samhällelig betydelse.....	10
2.2 Sej som fiskart och dess egenskaper.....	11
2.3 Riktlinjer för hantering av fiskprodukter.....	12
2.4 Mikrobiologiska risker vid hantering av fisk.....	12
2.4.1 Mikrobiell flora hos fisk.....	12
2.4.2 Förskämning av fisk; katalyserande mikroorganismer.....	13
2.4.3 Patogener.....	14
2.4.4 Parasiter.....	16
2.5 Hantering och konsekvenser vid fångst, transport och lagring innan tillagning.....	16
2.5.1 Hantering och konsekvenser vid fångst.....	16
2.5.2 Hantering och konsekvenser vid transport och lagring.....	17
2.6 Tillagning.....	18
2.7 Förpackningsmetoder och dess inverkan på mikrobiell hållbarhet.....	18
2.7.1 Luft.....	18
2.7.2 Modifierad och icke Modifierad atmosfär.....	19
2.7.3 Vakuum.....	20
2.8 Lagringstid och mikrobers tillväxtfaser.....	20
2.9 Sammanfattning av faktorer som påverkar den mikrobiella kvaliteten hos fisk.....	22
3. Metod	23
3.1 Litteraturstudie.....	23
3.2 Mikrobiell provtagning.....	23
3.2.1 Förberedelse.....	23
3.2.2 Tillagning av fisk.....	24
3.2.3 Provtagning av fisk.....	24
3.3 Mätning av pH-värde.....	25
3.4 Sensorisk bedömning.....	25
4. Resultat	26
4.1 Provsättning.....	26
4.2 pH-mätning.....	26

4.3	Statistiska beräkningar av pH-mätning.....	27
4.4	Ej vetenskapligt förankrad sensorisk bedömning.....	28
5.	Diskussion.....	29
6.	Slutsats.....	32
7.	Referenslista.....	33
8.	Bilagor.....	35
8.1	Bilaga 1: Kylkalibrering.....	35
8.2	Bilaga 2: Provtagning PCA Ej modifierad atmosfär.....	36
8.3	Bilaga 3: Provtagning PCA Modifierad atmosfär.....	38
8.4	Bilaga 4: Provtagning VRBD Ej modifierad atmosfär.....	40
8.5	Bilaga 5: Provtagning VRBD Modifierad atmosfär.....	42
8.6	Bilaga 6: Mätning av pH-värde Ej modifierad atmosfär.....	44
8.7	Bilaga 7: Mätning av pH-värde i Modifierad atmosfär.....	45
8.8	Bilaga 8: Beräkningar.....	46

1. Inledning

I samråd med en utvald kommun identifierades ett problem angående lagring av fiskrätter inom deras måltidsdistribution. Den ursprungliga informationen var att maträtter innehållande fisk hade en hållbarhetstid på 8 dagar efter tillagning och paketering, medan övriga maträtter hade 12 dagar. Motiveringen till lagringstiden var att fisk generellt sett har en kortare hållbarhetstid och är ett känsligt livsmedel. Kommunen såg ett behov av att utforska möjligheten att förlänga hållbarhetstiden för fisk och därmed förbättra logistiken, utan att kompromissa med livsmedelssäkerheten.

Det visade sig senare att lagringstiden för tillagade fiskrätter var 12 dagar i modifierad atmosfär. Det innebär att fisk, liksom övriga rätter, ges samma hållbarhetstid. Detta skapade misstanke om att fisken inte kunde ställas som likvärdig till övrig förpackad mat ur en mikrobiologisk säkerhetsaspekt när det gäller lagringstiden.

Detta examensarbete syftar till att utforska och analysera hur lagringsmetoder med modifierad och ej modifierad atmosfär påverkar lagring och hållbarhet för fiskrätterna. Målet är att föreslå lämpliga förbättringar för att säkerställa en hållbar och säker hantering av fiskprodukter. Genom en mikrobiell undersökning kan man verifiera huruvida den mikrobiologiska säkerheten är säkerställd. Under den mikrobiella undersökningen kommer det att undersökas om den färdiglagade och kallpaketerade fisken kan lagras lika länge som övriga maträtter, sett utifrån nuvarande rutin.

Kommunen har också visat intresse för att utforska hur den mikrobiella kvaliteten påverkas när modifierad atmosfär inte används vid paketering. Enligt den nuvarande rutinen lagras rätter med fisk i högst 3 dagar om modifierad atmosfär inte används. Intresset för en rutin med förpackningar utan modifierad atmosfär grundas i ett eventuellt krisberedskap, där omdirigering av rutiner krävs utifrån en förändrad produktion.

Ett resultat där möjlighet till ökad lagringstid utan mikrobiella risker påvisas, både under modifierad och ej modifierad atmosfär, kan leda till en effektivisering av logistiken rörande partens måltidsdistribution för äldreomsorgen.

Den mest förekommande fisken som används för fiskrätter hos kommunens måltidsdistribution är sej, (*Pollachius virens*, eng. saithe, pollock), på grund av tillgänglighet och pris. Denna studie kommer därför vara fokuserad på denna typ av fisk.

En vidare upplevelse är att direktiven om lämplig innertemperatur skiljer sig åt i organisationen. Ledningen menar på att en temperatur på 52°C används för att bibehålla sensorisk kvalitet. Däremot använder personalen en innertemperatur till 72°C för att försäkra sig om att den förpackade fisken är säker ur ett mikrobiologiskt perspektiv, då måltiderna ska kylas ner och förpackas över en tid. Differensen mellan 52°C och 72°C kan spela en stor roll i den mikrobiella kvaliteten, samtidigt som det kan göra skillnad på den sensoriska kvaliteten. Som tidigare nämnt menar ledningen att rätter innehållandes fisk ska märkas med en hållbarhetstid på 8, men att de idag lagras under 12 dagar. Om detta är en feltolkning av information mellan författarna till denna studie och berörda parter, eller internt mellan parterna i kommunen, behöver undersökas närmare.

Kommunen väljer att köpa fryst fisk, vilket kan minska risken för levande parasiter och ge en smidigare hantering då den kan fortsätta att fryslagras vid leverans. Dock återstår risker med kvarvarande och växande bakterier. Beroende på vad resultatet av den mikrobiella undersökningen kommer att visa, kan eventuellt nya hållbarhetstider fastställas, vilket i sin tur torde kunna bidra till mindre svinn hos vårdtagare. Detta kan även bidra till vidare positiva effekter, såsom ett mindre matsvinn, mindre klimatpåverkan, ett mer kostnadseffektivt arbetssätt samt nöjdare vårdtagare.

1.1 Syfte

Syftet med detta examensarbete är att undersöka påverkan av modifierad och en icke modifierad atmosfär inom en förpackning samt systematiskt analysera effekterna av lagringsmetod och tidsaspekter i mikrobiell kvalitet hos fisk.

1.1.1 Problemformulering

1. Hur påverkar olika förpackningsmetoder mikrobiologisk kvalitet hos tillagad fisk?
2. Vilken inverkan har varierande lagringstider på mikroorganismer i tillagad fisk, särskilt med olika förpackningsmetoder?
3. Finns det signifikanta samband mellan förpackningsmetod, lagringstid och mikrobiell kvalitet hos fisk?
4. Vad är den längsta lagringstiden för att säkerställa livsmedelssäkerhet utan att kompromissa med den sensoriska kvaliteten hos tillagad fisk?
5. Är produkten som studiens samarbetspartner producerar lämplig för konsumtion ur både mikrobiologiskt och sensoriskt perspektiv, både när nuvarande rutin följs och när en eventuell reservrutin tillämpas?

1.2 Hypotes

Hypotesen för denna studie tros vara att den mikrobiologiska aktiviteten kommer att öka i korrelation med lagringstid, denna korrelation baseras sedan på vilken innertemperatur som används då detta kan vara avgörande för mikrobiologisk tillväxt. Det antas att i denna studie kommer det inte ske någon identifierbar mikrobiologisk tillväxt då innertemperaturen i fisken har uppmätts till 72°C.

1.3 Avgränsningar

- Denna studie avgränsar sig till att undersöka en specifik fiskart, sej (Pollock, *Pollachius virens*), från en enskild leverantör och under ett enda provtagningstillfälle. Undersökningen kommer att fokuseras på fryst fisk som tillagas vid en specificerad temperatur och en given tillagningsmetod.
- Studien kommer att begränsa sig till att analysera hur den mikrobiella kvaliteten påverkas och förändras när fisken lagras separat utan andra ingredienser.
- Den mikrobiologiska analysen kommer att fokusera på att undersöka den totala tillväxten av mesofila aeroba mikroorganismer, vilket innebär organismer som trivs i måttliga temperaturer (20-45°C) med tillgång till syre, samt närvaron av koliforma indikatorbakterier i familjen *Enterobacteriaceae*.
- Studien utgår ifrån den tillagningsmetod som används inom kommunen, vilket är tillagning i ugn med tillförsel av ånga. Den mikrobiella provtagningen undersöker därmed inte hur olika tillagningssätt påverkar den mikrobiella kvaliteten. Förpackningarna för maträtterna är inte sterila och behandlas ej med steriliseringsteknik såsom UV-strålning eller behandling med etanol innan provtagning. Fisken provtas inte för undersökning av mikrobiell förekomst innan och precis efter tillagning.
- I den mikrobiella undersökningen tas ingen hänsyn till att den kallpaketerade fisken kommer återuppvärmas i mikrovågsugn alternativt ugn när den bedöms som tjänlig eller ej. I verkligheten skulle denna process kunna eliminera potentiella mikroorganismer.
- Huvudfokus i denna studie är den mikrobiella undersökningen grunden till en utredning av samband mellan lagringstid och mikrobiell tillväxt. Genom litteraturstudie undersöks ett bredare spann av vad som kan påverka kvaliteten hos fisk, och agerar som diskussionsunderlag.

2. Teoretisk bakgrund

Följande litteraturstudie har använts som bas och fördjupning i ämnet mikrobiologi i relation till kvalitet hos fisk. Detta för att få en djupare förståelse för hur olika faktorer har en inverkan på fisken och hur effekten av dessa påverkar den tillagade fiskens slutgiltiga kvalitet och livsmedelssäkerhet. En djupare förståelse underlättar analysen, och kan därmed skapa en bättre förmåga att dra slutsatser kring det slutgiltiga resultatet.

2.1 Positiva aspekter med fisk; kulturell, näringsmässig och samhälllig betydelse

Fisk har en stor betydelse i samhället och försäljningen av livsmedel med ursprung från världens hav och sjöar har ökat successivt med tiden. Idag har cirka 87,5 miljoner ton mat härkomst från hav och sjöar i form av fisk, skaldjur, alger och musslor. Trots ett mer kontrollerat fiske och odling av havsmat har man ändå sett att vattenkvaliteten har förändrats samt att antalet insjuknade fiskar och havsdjur har ökat. I samband med sjukare havsdjur ökar risken att människor blir sjuka vid konsumtion av fisk och övriga havsdjur, främst på grund av mikrobiologiska hot. (Dayana Senthamarai, Rajan & Bharathi 2023) Därför är det viktigt att se till att äta fisk från områden med godtagbar kvalitet inom området där fisk ska tas upp, för att säkerställa en säker och konsumerbar fisk. Exempel på märkningar som ser över detta är MSC, ASC och KRAV-märkning. (Livsmedelsverket 2024a)

Även Sveriges befolkning har länge ätit fisk vilket har influerat den svenska kosten. Traditionella rätter som surströmming, sillinläggningar samt lutfisk är rätter som oftast förekommer på bordet under firandet av olika traditioner. Förutom de historiska aspekterna har även fisk andra fördelar, bland annat dess höga proteininnehåll, låga halter av fett samt att det är ett miljövänligt alternativ till det röda köttet.

Fettet i fisk är av hög kvalitet då det innehåller den fleromättade fettsyran omega 3, som inte återfinns i det röda köttet. Fördelen med fleromättade fetter är att risken för hjärt- och kärlsjukdomar minskar, vilket kan leda till ett hälsosammare och längre liv. (Livsmedelsverket 2024b) Fisk innehåller en förhållandevis låg fetthalt jämfört med andra köttyper samt även ett högkvalitativt protein. Dock är det viktigt att poängtera att sammansättningen kan variera.

Variationen är stor mellan olika fiskarter, vilket kan bero på kost, migrationsmönster och lekperiod (Fernandes 2009).

Utöver fiskens hälsosamma näringsinnehåll bidrar även fisk till en lägre klimatpåverkan. Detta kan ske genom att minska intaget av rött kött och istället byta ut köttet mot fisk. Något som är viktigt att poängtera är att man bör välja fisk som hållbart fiskad för att undvika tråkiga och mindre önskvärda konsekvenser som till exempel överfiske. (RISE, u.å)

Inom måltidsverksamheten för äldre är det av yttersta vikt att tillhandahålla näringsrik och välsmakande mat. För att möta detta behov fokuserar kommunen på att tillaga mat som är både livsmedelssäker och näringsrik genom att erbjuda varierade och aptitretande måltider. Ett noggrant urval av livsmedel och dess kvalitet är avgörande när man arbetar med äldre människor. Exempelvis spelar fisk och feta mejeriprodukter en betydande roll för att säkerställa intaget av viktiga näringsämnen som protein, omega-3-fettsyror, samt olika vitaminer och mineraler.

Fisken som studeras i denna rapport är sej, vilket klassas som en mager fisk. Dock finns det även mellanfeta och feta fiskar. Utöver att vara en proteinkälla innehåller fisk även viktiga näringsämnen såsom D-vitamin, jod och selen. D-vitamin är särskilt viktigt för äldre människor, delvis på grund av bristen på solljus i Sverige och minskad aptit vid högre ålder. Denna vitamin spelar en viktig roll för att bibehålla benhälsa och immunfunktion. Jod är avgörande för sköldkörtelns funktion, medan selen är en antioxidant som bidrar till att skydda kroppens celler mot oxidativ stress. Genom att inkludera fisk och andra näringsrika livsmedel i äldres kost kan man bidra till att säkerställa deras välbefinnande och hälsa. (Livsmedelsverket 2019)

2.2 Sej som fiskart och dess egenskaper

Som tidigare nämnt är det sej som ligger som grund för den mikrobiella undersökningen. När fisken sej används syftar man generellt på typen gråsej, latin *Pollachius virens* och på engelska pollock eller saithe. Det är en torskfisk som finns i östra Atlanten, från Spanien till Island, och från Norge till Kolahalvön. Sejen betraktas som en pelagisk stimfisk som oftast rör sig nära ytan eller i grunt vatten. Den kan växa upp till 15 kg och 120 cm, men är vanligtvis inte längre än 90 cm. Säsongen för sej pågår året om, och fångstmetoder inkluderar trålning, garnfiske och krokfiske (Furugren 2016).

2.3 Riktlinjer för hantering av fiskprodukter

Fisk kan anses vara ett känsligt livsmedel ur ett mikrobiologiskt perspektiv, vilket påverkas av faktorer som hantering, tillagning och lagring. Fisk bör enligt Livsmedelsverket (2024a) upphettas till 60°C samt kylas ner till +8°C för att säkerställa att fisken är helt säker att förtära.

För att bedöma om ett livsmedel är säkert att konsumera ur mikrobiologisk synvinkel används olika gränsvärden. Dessa gränsvärden kan vara specifika för olika mikroorganismer eller för den totala mikrobiella tillväxten. Inom EU:s direktiv för mikrobiologiska gränsvärden finns inget till författarnas vetskap fastställt gränsvärde för tillagad fisk, och olika riktlinjer kan hämtas från olika källor. Gränsvärdet för totalantal varierar från log 4 CFU/g vid produktionstillfälle enligt Fernandes (2009), till mellan log 5 och log 7 CFU/g för förkokt fisk mellan produktionstillfälle och sista hållbarhetsdag enligt Turkkan, Cakli & Kilinc (2010). För regnbågslax anses enligt Kaba & Corapci (2014) gränsvärdet log 6 CFU/g vara acceptabelt för konsumtion. När det gäller *Enterobacteriaceae* kan ett gränsvärde på <log 2 CFU/g anses vara acceptabelt vid produktionsdatum, medan en maxgräns på log 4 CFU/g gäller vid slutet av hållbarhetstiden (Fernandes 2009; CFS 2014). Den efterföljande mikrobiella undersökningen i studien kommer utgå från en maxgräns för tjänlig produkt vid <log 5 för totalantal och <log 2 för *Enterobacteriaceae*.

2.4 Mikrobiologiska risker vid hantering av fisk

2.4.1 Mikrobiell flora hos fisk

Det underliggande köttet hos levande och friska fiskar kan betraktas som sterilt och bör inte innehålla några bakterier eller mikroorganismer. Dock, precis som med andra ryggradsdjur, finns det mikroorganismer på fiskens hud och i gälar samt mag- och tarmkanalen. Faktorer som påverkar mängden och typen av mikroorganismer hos fisk kan vara geografisk placering, fångstmetod och säsong. Fiskens mikroflora påverkas av mikrofloran i vattnet den lever i, där fisk från rent och kallt vatten generellt innehåller färre bakterier än de från varmt eller eutrofiskt vatten enligt Fernandes (2009).

Av de naturligt förekommande bakterierna i fisk utgör gram-negativa släkten den största delen, och de mest förekommande är *Shewanella*, *Pseudomonas Flavobacterium*, *Acinetobacter*, och *Moraxella*. Ytterligare vanligt förekommande släkten är av *Vibrinaceae*, såsom *Vibrio* och *Photobacterium*, samt *Aeromonadaceae* med arter inom *Aeromonas*. Vidare kan även gram-positiva bakterier inom släkter såsom *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* och *Corynebacterium* förekomma hos fisk (Fernandes 2009).

En av de främsta anledningarna till att fisk är ett känsligt livsmedel generellt kan bero på att de lever i ett kallt klimat. Detta leder till att närvarande mikroorganismer har en förmåga att leva och föröka sig i låga temperaturer, vilket benämns som att de är psykrotrofa. Då dessa bakterier tål lägre temperaturer leder det till att de kan föröka sig vid kylagring (Thougaard, Varlund & Møller Madsen 2007, s. 318).

2.4.2 Förskämning av fisk; katalyserande mikroorganismer

Även om det potentiellt sett finns ett antal patogena organismer i fisk som skulle kunna utgöra en risk för livsmedelssäkerheten tenderar koncentrationen vara låg och risken förhållandevis liten enligt Fernandes (2009). Detta beror på att de naturligt förekommande förskämningbakterierna i fisken har en högre tillväxt och gör fisken otjänlig för konsumtion innan tillväxt av patogena organismer eller toxinbildning. När det gäller mikrobiell hållbarhet av fisk är det således av intresse att minska tillväxten av nedbrytningsbakterier samtidigt som risken för tillväxt av patogena organismer undviks.

Den mikrobiella process som leder till förskämningen av fisk beror till stor del på reduktion av TMAO (Trimetylaminoxid), vilket är ett kväveinnehållande ämne som inte förekommer hos däggdjur, men som finns i marina fiskar, till TMA (Trimetylamin). TMA har en stark doft som ofta förknippas med den obehagliga doften av fisk. Detta sker genom att bakterieenzymer från exempelvis släktet *Pseudomonas* och *Shewanella* katalyserar processen. Ett nästkommande steg i förskämningen av fisk är proteolysen, nedbrytningen av protein. När detta sker bildas flyktiga och illaluktande ämnen som ammoniak och svavel. Ett ytterligare steg i förskämningen är lipolysen, nedbrytningen av fett, vilket sker enkelt då lipiderna i fisk innehåller en stor del omättat fett med dubbelbindningar, vilket leder till härskning (Thougaard, Varlund & Møller Madsen 2007, ss 316-318).

Som ovan nämnt katalyseras förskämningssprocessen till stor del av bakteriesläktet *Pseudomonas*. *Pseudomonas* är ett släkte av gramnegativa bakterier som har förmågan att orsaka förruttelse om de växer i livsmedel. De förekommer naturligt i både sötvatten och saltvatten, vilket innebär att det finns en risk för tillväxt i fiskprodukter. Förutom att släktet innehåller vissa patogena arter har de också en betydande roll i nedbrytningen av organiskt material. Vissa arter har hög lipolytisk (fettspjälkande) och proteolytisk (proteinnedbrytande) aktivitet vilket bidrar till förskämning av fisken. Vissa arter inom släktet *Pseudomonas* är psykrotrofa. Ett ytterligare gramnegativt bakteriesläkte som har många likheter med *Pseudomonas* är *Shewanella*, framförallt arten *S. Putrefaciens*, som även denna, är psykrotrof och kan leda till förskämning (Thougaard, Varlund & Møller Madsen 2007, ss 130-131).

2.4.3 Patogener

Patogena bakterier som förekommer i fisk kan delas upp i två grupper: de naturligt förekommande samt de förekommande till följd av kontamination. Av de naturligt förekommande är noterbara exempelvis *Clostridium botulinum*, *Plesiomonas shigelloides*, arter inom *Aeromonas* och patogen *Vibrio*. Vidare till följd av kontamination kan exempelvis *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* samt arter av *Salmonella* och *Shigella* förekomma. Den patogena bakterien *Listeria monocytogenes* kan förekomma i fisk både naturligt och till följd av kontamination (Fernandes 2009).

Clostridium botulinum är en bakterie vars toxiner kan direkt döda i mycket små mängder. Patogenen överlever genom dess sporer som återfinns i jord, hav och i tarmen i fiskar. Det är främst toxinet i huvudsak som utgör ett hot, kan även kallas för botulinumtoxin som ger sjukdomstillståndet botulism. På grund av förekomsten av dessa sporer bör livsmedelsproducenter vara uppmärksamma på denna typ av bakterie samt motarbeta risken av en spridning. Bakterien förökar sig i en syrefattig miljö och i låga temperaturer mellan 3 - 10°C, därav är det viktigt att lagerhålla fisk förpackad i vakuum och modifierad atmosfär i max 4 °C. Livsmedelsverket beskriver ingen avdödningstemperatur, då sporererna kan etablera sig trots

ogynnsamma förhållanden. Det innebär att avdödning inte minskar risken för att bakterien ska kunna återetablera sig inom ett livsmedel. (Livsmedelsverket 2023a)

Listeria monocytogenes är en patogen som orsakar sjukdomen listerios. Bakterien finns naturligt i naturen och tar därför fäste på många råvaror. Något som är allmänt känt är att *Listera* är svår att bli av med när den väl har tagit fäste i produktionslokaler. Bakterien förökar sig i kallare temperaturer och därför bör man förvara livsmedel under +4°C, för att undvika förökning av bakterien. Det är främst äldre och personer med nedsatt immunförsvar som är extra känsliga för listera, för att förebygga mot bakterien bör all kallpaketerad mat ätas innan utgångsdatum. Avdödning av bakterien sker vid en tillagning som går över 60°C. Den kallpaketerade fisken som denna studie behandlar skall återuppvärmas i mikrovågsugn efter lagerhållning, vilket potentiellt sett skulle kunna minska risken för insjuknande av *Listeria monocytogenes* då temperaturen kan avdöda mikroorganismer. (Livsmedelsverket 2024c)

Shigella är en patogen som inte förekommer naturligt i fiskar, utan kontamineras via avföringsvatten. Människor har svårt att hantera *Shigella* och blir sjuka av mycket små mängder vid förtäring av fisk och skaldjur. Fiskar fungerar annorlunda och insjuknar inte av denna bakterie utan lever vidare utan påverkan. När fisk har avdödats medverkar *Shigella* i förskämningssprocessen av fisken. När detta inträffar bryter den gramnegativa bakterien, likt tidigare nämnda förskämningssbakterier, ner TMAO till TMA, vilket resulterar i den karakteristiska doften som indikerar att fisken inte längre är färsk. (Furugren 2016. s 212). De personer som löper högre risk för att insjukna av fiskar som kontamineras är äldre och sjuka människor. *Shigella* avdödas vid en temperatur över 65°C, det är därför viktigt att upphetta fisken för att minska risken för insjuknande. (Livsmedelsverket 2023b)

E. coli (*Escherichia coli*) är en tarmbakterie som är vanligt förekommande. Bakterien tar fäste i både människor och livsmedel, däribland fisk. Bakterien sprids genom att vatten har förorenats med avföring, för att den ska överleva krävs det att den snabbt fäster sig i en värdkropp kort efter att kontaminering har skett i vattnet. Bakterien är värmekänslig och kan föröka sig i låga temperaturer. Vid inkorrekt upphettning av fisk kan det föreligga en hälsorisk. För att undvika insjuknande bör fisk upphetas till en temperatur över 50°C, detta på grund av att E-coli förökar sig kring en temperatur runt 37°C men även i högre temperaturer som 45-50°C. (Livsmedelsverket 2023c)

2.4.4 Parasiter

Förutom bakterier finns även andra mikroorganismer som kan utgöra ett hot mot både kvalitén och livsmedelssäkerheten, exempelvis parasiter. Dessa mikroorganismer överlever genom att ta fäste på ett värdjur.

Anisakis är en parasit i form av en spiralmask som är vanligt förekommande i fisk från havet och har en längd på 1-4 cm. Parasiten lever i magsäcken hos fiskar men tar gärna fäste i både fiskar och människor, därav är det viktigt att tillaga fisk från havet korrekt. Tillagning bör ske till en temperatur runt 55-60°C för att avdöda parasiten. Avdödning kan även ske genom att djupfrysa fisken till -18°C under 3 dygn. Parasiten kan ge symtom som illamående, kräkningar och magsmärtor som uppkommer kort efter förtäring. För att insjukna av parasiten krävs endast en levande mask för att bli sjuk. Ingen specifik riskgrupp finns för denna typ av parasit. (Livsmedelsverket 2023d)

Pseudoterranova decipiens är en parasit i form av en rundmask. Parasten fäster sig främst i fiskar som torsk och rötsimpa men kan även förekomma hos andra arter. Parasiten förekommer ofta i svenska vatten och kan liksom anisaki orsaka sjukdom genom att endast en levande mask förtärs. Symtomen vid förtäring är illamående, kräkningar och magsmärtor. Denna parasit kan också avdödas genom upphettning till 55-60°C eller genom djupfrysning till -18°C i minst 3 dygn. Ingen specifik riskgrupp finns för denna typ av parasit (Livsmedelsverket 2023e).

2.5 Hantering och konsekvenser vid fångst, transport och lagring innan tillagning

2.5.1 Hantering och konsekvenser vid fångst

När fiskar tas upp vid fångst sker det inte endast mikrobiella förändringar i muskulaturen utan även kemiska. Rigor mortis är en kemisk process som sker i alla djur oavsett om det gäller kött från fisk, fågel, nöt eller gris. Processen är mycket avgörande för vilken kvalitet köttet får efter rigor mortis. När fisk tas upp ur vattnet och avlivas startas processen rigor mortis. Rigor mortis är en process som sker post mortem, det vill säga efter fiskens död. Det slutgiltiga resultatet av rigor mortis är beroende av olika faktorer, bland annat vilken temperatur omgivningen hade vid fångst av fisken samt under vilken nivå av stress som fisken utsattes för. (Furugren 2016)

Vid avlivning av fisken sänks pH:et i fisken. Fisken får oftast inte ett pH-värde under 6 då halten glykogen i musklerna är lägre i fisk än i däggdjur som nöt och gris. Fisk innehåller vanligtvis en låg halt kolhydrater, vilket resulterar i att endast en liten mängd glykogen ansamlas i musklerna. Därför minskar pH-värdet inte i samma utsträckning efter döden som det gör för rött kött. Detta skapar en neutral och för många mikroorganismer en gynnsam miljö, däribland förskämningbakterier som *Shewanella* och *Pseudomonas* (Gram 2009).

Fångstprocessen kan ha stor inverkan på det förändrade pH-värdet. Stress under fångst kan göra att glykogenet i musklerna förbrukas redan innan fiskens död, vilket gör att pH-värdet inte sjunker drastiskt utan snarare lägger sig omkring pH 6.5-7.0. Detta pH-värde spelar en avgörande roll i utvecklingen och tillväxten av mikroorganismer i fisken (Furugren 2016).

Rigor mortis kan träda in redan 30 minuter efter död men kan också ta upp till ett par dygn efter att fisken läggs på is efter fångst. När rigor mortis processen har avslutats bör man ta hand om fisken genom att exempelvis filéa eller frysa fisken. Sker styckning av fisken under rigor mortis kan musklerna kontrahera och minska med cirka 15%. Temperaturen i omgivningen bör även vara låg vid styckning för att undvika att celler i musklerna förstörs. (Furugren 2016)

2.5.2 Hantering och konsekvenser vid transport och lagring

Vid fångst tas fisken upp direkt och avlivas. Därefter placerar man fisken direkt på is för vidare lagring. Rigor mortis sker och därefter fileas fisken. När fisken har förberetts väljs ofta djupfrysning som lagringsmetod. Under lagring inför djupfrysning bör fisk lagras på is i en temperatur runt 0°C, för att undvika att processer inom fiskens naturliga mikroflora och enzymssystem ska börja accelerera. Konsekvenserna av fel lagerhållning innan frysning kan leda till snabbare nedbrytning och kvalitetsförsämringar. Man kan utöver ovan nämnda förslag utföra andra behandlingar för möjliggöra lagring och ökad hållbarhet av nyligen upptagen fisk, detta genom exempelvis saltning, torkning och syring. (Furugren 2016)

Vid djupfrysning som lagringsmetod krävs det en kontrollerad nedfrysning, för att undvika att kvaliteten och livsmedelssäkerheten påverkas. För att undvika att fiskens muskler kontraherar är det viktigt att fisken genomgår rigor mortis innan djupfrysning för att behålla god kvalitet. Därefter fryses fisken ofta snabbt till - 18°C då detta har visat sig bevara fiskens kvalitet bäst.

Fryslagring används främst för att stoppa kemiska och mikrobiologiska processer, däribland enzymaktiviteten och förökning av mikrober i fisken. (Furugren 2016)

För att bevara fiskens kvalitet bör fisken tinas upp snabbt i ett vattenbad. En snabb upptining utan vattenbad kan bland annat leda till att membranstrukturerna i fiskens celler går sönder, vilket resulterar i att enzymer från lysosomer läcker ut och påskyndar den kemiska nedbrytningen av fisken. (Furugren 2016)

2.6 Tillagning

Som tidigare beskrivet läggs grunden för den mikrobiella kvaliteten hos fisk många steg före tillagnings- och lagringsprocessen. Redan i fiskens levnadsmiljö, fångst, hantering och transport kan fisk kontamineras eller felaktigt hanteras vilket leder till tillväxt av mikroorganismer. För att motverka försämrade kvalitet och eventuell negativ inverkan på individers hälsa behöver således fisk oftast tillagas för att undvika mikrobiologiska risker. Fisk kan tillagas genom olika metoder som exempelvis kokning, sous vides, stekning, gravning och rökning. Ibland väljer man inom vissa kulturer att inte tillaga fisk genom någon metod alls utan serverar då rå fisk som den är. Det är därför viktigt att se till att fisken är rätt hanterad under fångst samt att rätt lagerhållning i låg temperatur har varit kontinuerlig.

2.7 Förpackningsmetoder och dess inverkan på mikrobiell hållbarhet

2.7.1 Luft

Lagerhållning av tillagad och förpackad mat kan utföras i en icke modifierad atmosfär såväl som i en modifierad atmosfär. Vid val av icke modifierad atmosfär sker förvaringen exempelvis i en livsmedelsgodkänd förpackning som är försluten med en plastfilm. Därefter kan den lagerhållas fryst eller i kyl. Sker förvaringen endast i kyl är rekommenderad förvaring i 5 dagar för att säkerställa att produkten är säker att förtära. Problematiken med en förpackning utan modifierad atmosfär är att de kemiska processerna fortlöper, framförallt den enzymatiska aktiviteten. Det beror på att syretillgången i förpackningen avspeglar den naturliga miljön. Konsekvensen av hög enzymaktivitet kan leda till missfärgning och snabbare nedbrytning av fisken. Förutom att livsmedlet ska vara mikrobiologiskt säkert bör även den sensoriska upplevelsen vara godkänd.

Dessa aspekter kan skapa problematik vid bestämmande av hållbarhetstid. (Sjöholm & Lundmark 2014)

2.7.2 Modifierad och icke Modifierad atmosfär

Modifierad atmosfärsförpackning (MAP) är en skyddande förpackningsteknik som används för att förlänga hållbarheten hos fisk, fiskprodukter och även andra typer av livsmedel, genom att förpackning sker i en atmosfär med en gassammansättning som förhindrar mikrobiell tillväxt och oxidationsreaktioner (Kaba & Corapci 2014). En grundläggande förutsättning för mikrobiella tillväxten är tillgång till syre (O_2), och lagring i en miljö med lägre syrenivå förlänger hållbarheten på fisk genom att inhibera mikrobiell tillväxt och autoxidation. Den viktigaste gasen för modifierad atmosfär är koldioxid (CO_2) då den hämmar tillväxt av svamp, jäst och bakterier (Kaba & Corapci 2014). När tillgång till O_2 minskar sker en viss fermentation av sockerarter i fisken, vilket leder till ett lägre pH-värde. Detta i kombination med CO_2 hämmar tillväxt av gramnegativa förskämningsbakterier, vilket ger utrymme för tillväxt av främst grampositiva organismer som i sin tur har en lägre tillväxthastighet (Fernandes 2009).

CO_2 är den gas som till största del förlänger den mikrobiologiska hållbarheten hos fisk, men en för hög koncentration kan påverka fiskens kvalitet negativt genom att skada dess struktur och påverka sensoriska egenskaper (Kaba & Corapci 2014). För att kompensera detta används ofta kvävgas (N_2), som är mindre invasiv och inhiberar främst aeroba mikroorganismer, är luktfri samt minskar oxidativ härskning (Fernandes 2009). Då fisk kan variera i sammansättning är olika gassammansättningar rekommenderade för att främja hållbarheten. För vit fisk och skaldjur har blandningen 40% CO_2 , 30% N_2 och 30% O_2 visat sig mest fördelaktig. Gällande fet fisk rekommenderas istället 60% CO_2 och 40% N_2 eller 40% CO_2 och 60% N_2 (Kaba & Corapci 2014). Att en halt av O_2 har visat sig positiv för vit fisk och skaldjur kan bland annat bero på att det minskar risken för tillväxt av anaeroba bakterier som *Clostridium botulinum*, vilket torde vara positivt ur ett säkerhetsperspektiv. Vidare har en halt av O_2 inte visat sig lika positiv för fet fisk, då fetthalten i kombination med O_2 ökar risken för fettoxidation (Ozogul, Ozogul & Kuley 2006).

2.7.3 Vakuum

Vakuumförpackning innebär att produkten placeras inuti ett förpackningsmaterial med låg syrepermeabilitet, följt av borttagning av luft, förslutning och den gasformiga atmosfären elimineras nästan helt. Till följd av att det fortfarande sker reaktioner förändras atmosfären i den förslutna paketeringen efter lagring. Dessa förändringar orsakas av mikrobiell aktivitet och resulterar i en ökning av koldioxidhalten (CO₂) med cirka 10-20%. Den förhöjda CO₂-halten kan ha effekten att hämma tillväxten av oönskade mikroorganismer, särskilt aeroba bakterier, vilket i sin tur kan förlänga hållbarheten på livsmedel. Inhiberingen av mikrobiell tillväxt beror på att aeroba förskämningsbakterier är känsliga för CO₂ och tillväxten sker långsammare. Dock kan anaeroba bakterier växa i denna syrefria miljö, vilket skulle kunna utgöra en risk för livsmedelssäkerheten, särskilt genom ackumulering av toxin från *Clostridium botulinum* (Das, Alice, Hossain, Islam & Mehbub 2021).

2.8 Lagringstid och mikrobers tillväxtfaser

En faktor som har en stor inverkan på den mikrobiella tillväxten i ett livsmedel är tiden. Om det efter tillagning finns förekomst av mikroorganismer och förhållandena är gynnsamma kommer det att ske tillväxt. Under tillväxten går mikroorganismerna igenom ett antal faser, och ju fler faser som de över tid hinner gå igenom, desto mer av livsmedlets näring har förbrukats, nedbrytningsprodukter skapats och livsmedlet blir otjänligt.

Den första fasen benämns som lagfas. I denna fas genomgår mikroorganismerna en period av anpassning till de nya förhållandena i miljön och mikroorganismer syntetiserar nödvändiga enzymer och proteiner för att kunna utnyttja tillgängliga näringsämnen effektivt. Enskilda celler blir större men antalet celledelningar är lågt. Längden på lagfasen kan påverkas av faktorer som komplexiteten i näringskällan och storleken på den ursprungliga populationen, samt hurvida mikrober innehåller en låg halt av ATP, ribosomer och andra tillväxtfaktorer. Fasen är således påverkad av förutsättningarna i sammansättningen i tillväxtmiljön, och handlar om att mikroorganismerna gör anpassningar och förberedelser för tillväxt (Thougaard, Varlund & Møller Madsen 2007, s. 110).

I nästa tillväxtfas, den logaritmiska fasen, multipliceras mikroorganismerna snabbt och konstant så länge som tillgängliga näringsämnen och andra tillväxtfaktorer är gynnsamma. Under denna fas är tillväxten maximal och kan observeras som en brant stigning på tillväxtkurvan. Det som avgör att tillväxten avstannar är att det blir en brist på tillgänglig näring samt att det skapas nedbrytningsprodukter, exempelvis syrabildning som sänker pH-värdet till en så pass låg nivå att miljön ej längre är gynnsam (Thougaard, Varlund & Møller Madsen 2007, s. 111).

I nästkommande fas, den stationära fasen, når mikroorganismerna en jämvikt mellan tillväxt och död. Detta på grund av begränsande faktorer som exempelvis brist på tillgängliga näringsämnen och nedbrytningsprodukter. Under denna fas konkurrerar mikroorganismerna om begränsade resurser och antalet nybildade celler och celler som dör är lika många, vilket resulterar i en stabil population. Även om förekomsten av celler ej ökar kan aktiviteter som sporbildning fortfarande ske (Thougaard, Varlund & Møller Madsen 2007, s. 110).

I den sista fasen, deklinationsfasen, minskar populationen av mikroorganismer när celldöden överstiger celldelning. Faktorer som ökning av toxiner eller skadliga miljöförhållanden kan påskynda denna fas. Vissa mikroorganismer kan sakna överlevnadsstrategier för att överleva under ogynnsamma förhållanden och upplever därför en snabb minskning i antal. Andra mer resistenta mikroorganismer överlever under en lång tid, och exempelvis sporbildande bakterier och dess fria sporer kan överleva en näst intill obegränsad tid (Thougaard, Varlund & Møller Madsen 2007, ss. 111-112).

Lagringstiden är således betydande för den mikrobiella kvaliteten. En längre lagringstid ger mikroorganismer mer tid att anpassa sig till och etablera sig i och runt om produkten. Detta skulle därför kunna leda till att mikroorganismer har möjlighet att överleva och börja växa även under ogynnsamma förhållanden produktkvaliteten försämras. Sammanfattningsvis torde det gå att utgå ifrån att en noggrann övervägning av lagringstiden i samband med andra påverkande faktorer är avgörande för att minimera risken för mikrobiell tillväxt och bibehålla produktens hållbarhet och kvalitet.

2.9 Sammanfattning av faktorer som påverkar den mikrobiella kvaliteten hos fisk

För att sammanfatta litteraturstudien kan man genom ovanstående information utläsa några typiska faktorer som kan bli direkt avgörande för hur fiskens kvalitet och livsmedelssäkerhet kommer att bli efter hantering och tillagning. Se nedanstående punkter.

- Temperatur och miljö i vattnet innan upptag av fisk.
- Hantering, Transport och lagringsmetod före tillagning.
- Tillagningsmetod och innertemperatur.
- Hantering och lagringsmetod i förpackning efter tillagning.
- Slutlig uppvärmning av lagerhållen maträtt.

3. Metod

3.1 Litteraturstudie

Examensarbetet består av en litteraturstudie som genomförts för att samla in relevant information i form av vetenskapliga rapporter, artiklar, avhandlingar, livsmedelsverkets databas och böcker från tidigare forskning inom området livsmedelsteknik. Litteraturstudien baseras på sökningar i vetenskapliga databaser, inklusive men inte begränsat till LubSearch och Google Scholar. Sökstrategin inkluderade nyckelord och fraser relaterade till ämnet som är av betydelse för uppgiftens syfte och mål. Efter att ha granskat och utvärderat den insamlade litteraturen, sammanställdes och analyserades relevant information för att få insikter, jämförelser och förståelse för området rörande aspekter inom fisk, paketering och mikrobiell säkerhet.

3.2 Mikrobiell provtagning

Provtagningsmetoden innefattade användning av två olika medier för mikrobiell analys: Totalt antal mesofila aeroba mikroorganismer och indikatorbakterier inom *Enterobacteriaceae*. För totalt antal användes förberedda petriskålar av agar från VWR (Culture Media, Ready To Use, In Plates) av typen Total Plate Count (TPC) och Violet Red Bile Dextrose (VRBD) som användes för detektion av *Enterobacteriaceae*.

I studien benämns prover lagrade under ej modifierad atmosfär (EJMAP) och modifierad atmosfär (MAP). För de två atmosfärerna följer numrering EJMAP3, EJMAP5 och EJMAP7 och MAP8, MAP10, MAP12 och MAP14, vilket motsvarar lagringstiderna. Proverna vid lagringstid 14 dagar undersöktes endast sensoriskt samt genom pH-mätning.

3.2.1 Förberedelse

1.0 g peptonpulver samt 8.0g NaCl vägdes upp och överfördes till 1 L glasflaska. 1000ml dH₂O mättes upp och blandades i glasflaska med pepton och vatten. Omrörning gjordes med magnet tills blandningen homogeniserades. 90 ml peptonvatten mättes upp i 100 ml mätglas och överfördes till 3 st 100 ml glasflaskor. Korken skruvades i första gången på flaskorna. Provrör fylldes med 9 ml peptonvatten med dispenserpipett. Därefter autoklaverades peptonvatten, provrören och glaskulor som användes under provsättningarna.

3.2.2 Tillagning av fisk

Fisk (Ryggfilé av Sej (*Pollachius virens*), vildfångad med ursprungsland Kina, MSC-märkt) tinades upp i kyl på ett metallbleck. Fisken portionerades (75 g/portion) efter upptining och placerades sedan i ett nytt bleck. Fisken tillagades i ugn med ånga på 80°C upp till 72°C i innertemperatur. Fisken togs ut ur ugnen och sattes in i ett nedkylningsskåp. Fisken togs ut när den har nått +8°C innertemperatur. Fiskbitarna förpackades enskilt, varav 8 fiskbitar förpackades i icke modifierad atmosfär och 8 fiskbitar i modifierad atmosfär. Den modifierade atmosfären bestod av en gasblandning med 30% CO₂ och 70% N₂. Förpackningarna placerades i kylboxar efter paketering. Dessa transporterades sedan till institutionen för processteknik och tillämpad biovetenskap på LTH i Lunds kommun. Proven lagrades i kyl med temperatur 7.4±0.4°C (Bilaga 1). Fisk paketerad utan MAP lagrades i 3, 5 och 7 dagar. Fisk paketerad med MAP lagrades 8, 10 och 12 dagar, samt ett extra prov i 14 dagar.

3.2.3 Provtagning av fisk

Petriskålar markerades upp för respektive prov-ID och spädserie (3 paket fisk * 2 olika atmosfärer). Av prov togs 2 st bitar á 10 gram från olika delar, dessa kördes på medel-växel separat i stomachern med 90 g peptonvatten under 2 minuter tills provet blev homogeniserat. 1 ml vätska togs från stomacherpåsen och överfördes till de förbereda provrören med 9 ml peptonvatten. Provröret vortexades och 1 ml överfördes till nästa provrör. Detta upprepades för hela spädserien (-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8 * 12 st). 0,1 ml från vardera provrör överfördes till petriskålar och fördelades med hjälp av steriliserade glaskulor. Petriskålarna inkuberades i inkuberingskåp. Efter inkubering räknades CFU och petriskålarna slängdes i designerade avfallslådor. Inkubering skedde enligt följande: För PCA-agar inkuberades proverna i 72 h i 30 grader och VRBD-agar inkuberades i 37 grader i 24 h. Efter inkubering beräknades eventuell tillväxt på petriskålarna.

Eventuella kolonier dokumenterades i bilaga 2, 3, 4, 5. CFU/g och log-värden beräknades i enlighet med beräkningsformler i bilaga 8. Eventuella avvikelser eller observationer noterades och diskuterades för att säkerställa en grundlig rapportering.

3.3 Mätning av pH-värde

pH-värdet mättes i den tillagade och paketerade fisken med en pH-elektrod. Fisken provtogs innan det att mikrobiell provtagning genomfördes. Innan mätning kalibrerades pH-elektroden enligt tillverkarens anvisningar med användning av standardbuffertlösningar med kända pH-värden. pH-elektroden placerades i provet av tillagad och förpackad fisk och mätningen genomfördes. Mätningarna utfördes i kvadruplikat för att säkerställa noggrannhet i resultaten. Resultaten från varje prov dokumenterades och användes sedan för att analysera och utvärdera eventuella förändringar i pH-värden mellan provtyper, förpackningsmetoder och lagringstid.

3.4 Sensorisk bedömning

En kort och ej vetenskapligt förankrad sensorisk bedömning av fisken utfördes efter en specificerad lagringstid. Vid bedömningen inspekterades fisken okulärt för att observera eventuella förändringar i textur och utseende. Därefter genomfördes en olfaktorisk bedömning genom att dofta på fisken för att identifiera eventuella avvikande dofter eller lukt. Resultaten från den sensoriska bedömningen dokumenterades noggrant för att bedöma fisken kvalitativt och utvärdera eventuella förändringar över tid.

4. Resultat

4.1 Provsättning

I bilaga 2, 3, 4 och 5 går det att avläsa att provtagningarna generellt visade inga eller för få kolonier att beräkna. Förkortningen TFTC står för "too few to count". Resultatet av alla provtagningar går inte att analysera och beräkna. Ett fåtal provtagningar gav resultat men beslutades vara för få för att utföra en reliabel analys och beräkning.

4.2 pH-mätning

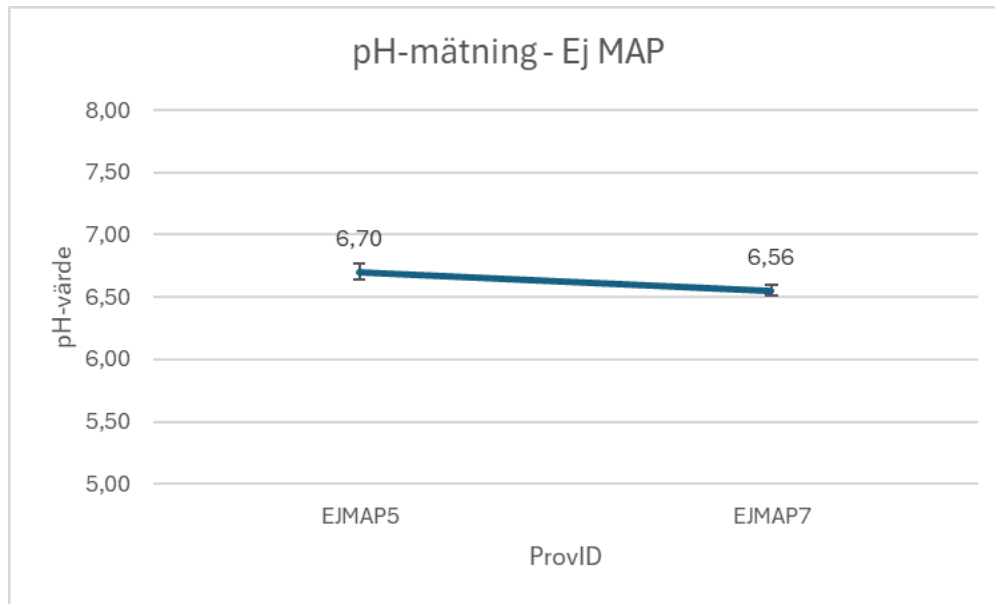


Diagram 1: Plottning av medelvärdet av fiskens pH-värde lagrad i en förpackning med ej modifierad atmosfär under olika lagringstider.

Beslut om att inkludera mätning av pH-värde togs efter att provsättning av EJMAP 3 ägt rum, därav finns endast resultat för EJMAP 5 och 7.

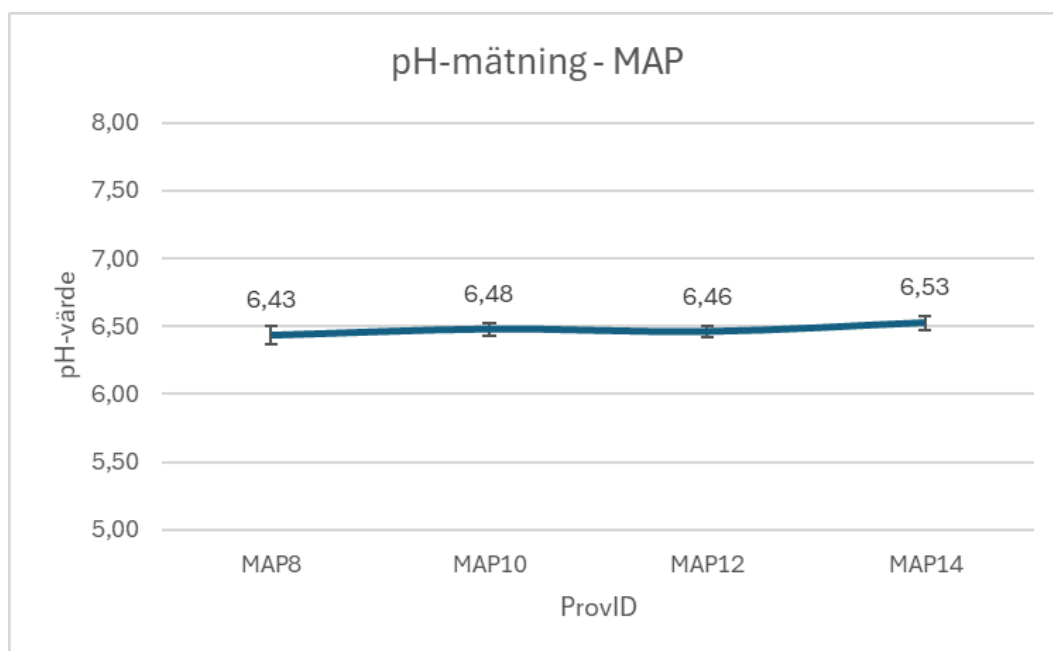


Diagram 2: Plottning av medelvärdet av fiskens pH-värde pH-värde lagrad i en förpackning med modifierad atmosfär under olika lagringstider.

4.3 Statistiska beräkningar av pH-mätning

Tabell 1: Statistisk beräkning och sammanställning av pH-mätning för MAP enligt beräkningsformler i bilaga 8 och värden i bilaga 7.

Variabel	Värde	Förklaring
t-test (8 till 10 dagar)	0.217	Ej signifikant skillnad i pH-värden mellan 8 och 10 dagar
t-test (10 till 12 dagar)	0.052	Ej signifikant skillnad i pH-värden mellan 10 och 12 dagar
t-test (12 till 14 dagar)	0.038	Signifikant skillnad i pH-värden mellan 12 och 14 dagar

T-test mellan lagringstid 8 och 10 gav 0,217. Ett p-värde större än 0,05 indikerar att det inte finns någon signifikant skillnad i pH-värden mellan 8 och 10 dagars lagringstid. T-test mellan lagringstid 10 till 12 gav 0,052. Ett p-värde nära 0,05 indikerar att det finns en möjlig tendens till skillnad i pH-värden mellan 10 och 12 dagars lagringstid. Detta p-värde är inte tillräckligt lågt för att vara statistiskt signifikant vid signifikansnivån 0,05. T-test mellan lagringstid 12 till 14 gav 0,038. Ett p-värde mindre än 0,05 indikerar att det finns en signifikant skillnad i pH-värden mellan 12 och 14 dagars lagringstid. Detta tyder på att det finns en statistiskt signifikant förändring i pH-värdena mellan dessa lagringstider. (Tabell 1)

4.4 Ej vetenskapligt förankrad sensorisk bedömning

Tabell 2: En tabell över en ej vetenskapligt förankrad sensorisk bedömning av fisk under olika lagringstider.

Lagringstid	Sensorisk bedömning
EJMAP 3	Luktfri. Fast och torr. Ingen förändring i färg.
EJMAP 5	Tydligare Ammoniakdoft. Släppt vätska. Svampig och något slemmig.
EJMAP 7	Mycket släppt vätska. Distinkt illaluktande doft. Tydlig orange/gul missfärgning.
MAP 8	Lite ammoniakdoft. Ingen missfärgning. Tveksam till förtäring utifrån sensorisk observation.
MAP 10	Distinkt ammoniakdoft. Lite orange missfärgning. Tveksam till förtäring utifrån sensorisk observation. Konsistensen är hård och något slemmig.
MAP 12	Mycket illaluktande ammoniakdoft. Märkbar orange missfärgning. Tveksam till förtäring utifrån sensorisk observation. Konsistensen är hård, trådig och lite slemmig.
MAP 14	Mycket illaluktande ammoniakdoft. Tydlig orange missfärgning. Nekar till förtäring utifrån sensorisk observation. Konsistensen är hård, trådig och slemmig.

Tabell 2 visar en ej vetenskapligt förankrad sensorisk bedömning som utfördes innan provtagning av den tillagade och förpackade fisken. Den tydliggör upplevelsen från varje prov och svaren kan enkelt jämföras.

5. Diskussion

Resultatet av den mikrobiella undersökningen har givit kunskap i hur stor påverkan innertemperaturen har på fisk ur både en mikrobiologisk och sensorisk aspekt. Det man kan konstatera baserat på en analys av bilaga 2, 3, 4 och 5 är att med en innertemperatur på 72°C i fisken avdödas mesofila aeroba mikroorganismer samt koliformade indikatorbakterier i familjen *Enterobacteriaceae*. I vår litteraturstudie bekräftas vårt resultat då Livsmedelsverket (2024a) menar på att temperaturer över 60°C ska avdöda eventuella bakterier som kan befinna sig i fisk. Vi kan därför dra slutsatsen att vår hypotes stämde överens med det framtagna resultatet, då vi antog att det inte skulle ske någon mikrobiologisk tillväxt i fisken med en innertemperatur på 72°C. Det kunde alltså inte ske en mikrobiologisk ökning i korrelation med lagringstiden i denna undersökning.

Genom att titta på våra resultat från pH-mätningarna kan man utesluta en korrelation mellan mikrobiologisk aktivitet och sjunkande pH-värde. Det kan bekräftas genom framtagna vetenskaplig bevisning har tagits fram angående pH-värde i fisk. Furugren (2016) menar att fiskens pH-värde sällan går under 6 efter avdödning då mängden glykogen som samlas i musklerna i fiskar är liten. I diagram 1 och 2 kan man avläsa pH-värden som ligger precis ovanför 6 och förblir nästintill oförändrade under hela lagringstiden. Däremot påvisas en ökning av pH-värdet rent okulärt i diagram 2 men ingen tydlig korrelation kan konstateras. pH-ökningen skulle kunna härledas till den doft av ammoniak och aminer under den sensoriska bedömningen, vilka både är svaga baser. Vi kan däremot inte dra några paralleller mellan det ökande pH-värdet och den mikrobiologisk aktivitet som eventuellt kan finnas i fisken, då bakterieaktivitet kan sänka pH-värdet. Fernandes (2009) beskriver att en sänkning av pH-värdet främst sker på grund av att bakterier i fisken påverkas av den begränsade tillgången av syre i den förpackning med modifierad atmosfär och börjar därför en fermentering av sockerarter, och att detta leder till sämre tillväxt för förskämningbakterier. Att det i denna provtagningen skett en ökning av pH samt en doft av ammoniak, skulle således kunna betyda att miljön blivit mer gynnsam för bakterier som spjälkar TMAO till ammoniakdoftande TMA, även om vi inte sett en beräkningsbar tillväxt.

Vi bör även ta hänsyn till och notera att vi har gjort avgränsningar i vår provtagning då den inte inkluderar anaeroba bakterier, vilket gör att vi inte kan dra några slutsatser kring huruvida de bakterierna har etablerat sig i fisken. Det går således inte att helt avgöra om fisken är säker för konsumtion trots att vi inte sett någon tillväxt.

Beräkning av korrelation mellan pH-värde, lagringstid och mikrobiell aktivitet utfördes ej för pH-mätningen av EJMAP, eftersom pH endast mättes vid 5 respektive 7 lagringsdagar. Vid undersökning av MAP visades en statistisk bekräftad ökning av pH-värde mellan dag 12 och dag 14 (Tabell 1).

Resultaten visar att det finns en tendens till positiv korrelation mellan tid och pH-värden för fisken. Även om pH-värdena är högre efter längre lagringstid, är skillnaderna i pH-värden mellan vissa tidsperioder statistiskt signifikanta medan andra inte är det. Detta skulle kunna indikera olika kemiska eller biologiska processer som påverkar pH-värdena under olika stadier av lagringen. Det är dock viktigt att notera att mätning av pH-värde inte genomfördes på proven innan förslutning och lagring och att det inte är samma replikat som mäts vid varje lagringstid. Det går därför inte att avgöra om pH-värdet har förändrats över tid i ett specifikt prov. Syftet med pH-mätning var att jämföra med mikrobiell tillväxt.

Problemformulering 1-3 (s 6) kan inte besvaras då vår undersökning har visat att det inte finns någon mikrobiell aktivitet baserat på våra avgränsningar. Det innebär att i denna undersökningen vet vi inte om det finns några signifikanta samband mellan förpackningsmetod, lagringstid och mikrobiell kvalitet hos fisk som problemformulering nummer 3 beskriver. Vi kan inte heller dra någon slutsats kring problemformulering nummer 2, om varierande lagringstider med olika förpackningsmetoder har någon specifik inverkan på mikroorganismer då det inte finns tillräckligt med resultat för att analysera detta. Konsekvensen av att vår mikrobiella undersökning inte har gett resultat gör att vi inte heller kan besvara problemformulering nummer 1, gällande förpackningsmetoders påverkan på den mikrobiologiska kvaliteten i fisken.

Under den mikrobiella undersökningen utfördes en ej vetenskapligt förankrad sensorisk bedömning som sammanfattats i tabell 2. Bedömningen utfördes i huvudsak för att kunna

undersöka eventuella samband mellan den sensoriska upplevelsen och den mikrobiologiska aktiviteten. Utifrån bilaga 2 - 5 kunde man som tidigare nämnt konstatera att ingen tillväxt har skett under provtagningen och därför blir det svårt att se några samband relaterade till den mikrobiologiska aktiviteten. Däremot väcks det funderingar kring vad som faktiskt skapar den tydliga missfärgningen, slemmiga vätskan och den distinkta doften av ammoniak. I litteraturstudien menar Sjöholm & Lundmark (2014) att en enzymatisk missfärgning kan skapas inom en syrefattig miljö, vilket kan ses som en förklaring till den upplevda orange/gula färgen. Vi finner ingen vidare förklaring till varför doften och den slemmiga vätskan har skapats, men vi tror att det kan beror på anaeroba bakterier som vi har valt att avgränsa oss ifrån.

Vi kunde under de sensoriska bedömningarna också detektera en viss skillnad mellan fiskarna som paketerats i de två olika atmosfärerna, modifierad och ej modifierad atmosfär. De fiskar som paketerats i en ej modifierad atmosfär hade en mer tydlig och skarp doft av ammoniak och upplevdes mer slemmiga än vad de fiskar som paketerats i den modifierade atmosfären. De fiskar som paketerats i modifierad atmosfär hade däremot en tydligare missfärgning och upplevdes som mer trådig än de fiskar som förpackades i en ej modifierad atmosfär. Dessa observationer kan inte kopplas till någon vetenskaplig bevisning i litteraturstudien, vilket öppnar för en framtida utredning.

Genom den sensoriska bedömningen kan vi besvara de två sista problemformuleringarna. Problemformulering nummer 4 och 5 (s. 6) besvaras genom att lagringstiden bör sänkas utifrån den sensoriska bedömningen då fisken inte upplevdes rent okulärt som aptitretande eller inbjudande. Något att ta hänsyn till här är att undersökningen endast gjordes med fisk, därav kan man inte basera den sensoriska bedömningen på den riktiga helhetsupplevelsen när rätten serveras komplett.

Med hänsyn till att de äldre oftast får minskad aptit (Livsmedelsverket 2019) bör man se över den sensoriska upplevelsen av fiskrätterna efter att lagring har skett. Trots att fisken är mikrobiologisk säker utifrån våra avgränsningar bör man ta hänsyn till att det finns andra livsmedel samt bakterier som vi har avgränsat oss ifrån som kan göra fiskrätterna osäkra rent

mikrobiologiskt. Vi kan alltså inte med säkerhet säga att fisken är mikrobiologiskt säker då avgränsningar har gjorts.

För att avsluta diskussionen anser vi kunna genom en utförd mikrobiella undersökning av tillagad fisk förpackad i två olika atmosfärer påstå att vi har uppnått vårt syfte med studien. I den mikrobiella undersökningen och litteraturstudien har lagringstid, olika förpackningsmetoder och mikrobiell aktivitet observerats och analyserats.

6. Slutsats

De slutsatser vi kan dra är att med en innertemperatur på 72°C i fisken avdödas mesofila aeroba mikroorganismer samt koliformade indikatorbakterier i familjen *Enterobacteriaceae*, baserat på de avgränsningar som gjorts. Det gick inte heller att se att det fanns någon korrelation mellan den mikrobiologiska aktiviteten och lagringstiderna, då det inte skedde någon tillväxt. Något man kunde observera var att det istället fanns en korrelation mellan lagringstid och ett ökande pH-värde vilket var ett något oväntat resultat. Med hjälp av den sensoriska bedömningen kunde man se att trots att det inte skedde någon tillväxt baserat på våra avgränsningar ansågs fiskfiléerna inte särskilt aptitretande.

För att avsluta så kan vi dra slutsatsen att fisken kan inte anses som mikrobiologisk säker då vi såg tendenser till kvalitetsförändringar i fisken samt att man bör se över kvaliteten på fisken efter maximala lagringstid för att säkerställa att man serverar fisk som är god och aptitretande.

7. Referenslista

Centre for Food Safety, Food and Environmental Hygiene Department (2014) *Microbiological Guidelines for Food (For ready-to-eat food in general and specific food items)*.

https://www.cfs.gov.hk/english/food_leg/files/food_leg_Microbiological_Guidelines_for_Food_e.pdf

Das, K.C., Alice, E.J., Hossain, M.A., Islam, M.T. & Mehbub, M.F. (2021). Effects of vacuum and modified atmosphere packaging on the shelf life of Rohu fish (*Labeo rohita*) stored at refrigerated temperature (4°C). *International Food Research Journal*, 28(3), ss. 586-593. doi:10.47836/ifrj.28.3.18

Dayana Senthamarai, M., Rajan, M.R. & Bharathi, P.V. (2023) Current risks of microbial infections in fish and their prevention methods: A review. *Microbial pathogenesis*, 185, Artikel 106400. doi:10.1016/j.micpath.2023.106400

Gram, L. (2009) Microbiological Spoilage of Fish and Seafood Products. I Sperber, W. & Doyle, M. (red.) *Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. Springer New York. ss. 87-119. doi:10.1007/978-1-4419-0826-1_4

Livsmedelsverket (2024a) *Fisk och skaldjur - Råd*.

<https://www.google.com/url?q=https://www.livsmedelsverket.se/matvanor-halsa--miljo/kostrad/rad-om-br-a-mat-hitta-ditt-satt/fisk&sa=D&source=docs&ust=1713867143367489&usg=AOvVaw3LuDrocNviAyGsMX88nZ6D> [2024-04-23]

Livsmedelsverket (2024b) *Fleromättat fett, omega-3, omega 6*.

<https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/naringsamne/fett/fleromattat-fett-omega-3-och-omega-6> [2024-04-23]

Livsmedelsverket (2024c) *Listeria monocytogenes*.

<https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/bakterier-virus-parasiter-och-mogelsvampar1/bakterier/listeria-monocytogenes> [2024-04-23]

Livsmedelsverket (2023a) *Clostridium botulinum*

<https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/bakterier-virus-parasiter-och-mogelsvampar1/bakterier/clostridium-botulinum> [2024-04-23]

Livsmedelsverket (2023b) *Shigella - Provtagning*

<https://kontrollwiki.livsmedelsverket.se/artikel/182/shigella-provtagning> [2024-04-22]

Livsmedelsverket (2023c) *Escherichia coli*

<https://kontrollwiki.livsmedelsverket.se/artikel/154/escherichia-coli-> [2024-04-23]

Livsmedelsverket (2023d) *Anisakis (sprialmask)*

<https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/bakterier-virus-parasiter-och-mogelsvampar1/parasiter/anisakis#:~:text=g%C3%A4ller%20f%C3%B6r%20f%C3%B6retag-,Vad%20%C3%A4r%20Anisakis%3F,bukh%C3%A5lan%20hos%20den%20infekterade%20fisken.> [2024-04-23]

- Livsmedelsverket (2023e) Pseudoterranova decipiens (säl-el-ler torskmask).
<https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/bakterier-virus-parasiter-och-mogelsvampar/parasiter/pseudoterranova> [2024-04-23]
- Livsmedelsverket (2019) *Råd för att främja hälsosamma matvanor och förebygga fall hos äldre kvinnor och män*.
<https://www.livsmedelsverket.se/globalassets/publikationsdatabas/rapporter/2019/1-2019-nr-13---rad-for-att-framja-halsosamma-matvanor-och-forebygga-fall-hos-aldre-hanteringsrapport.pdf> [2024-04-23]
- Sjöholm, I. & Lundmark, B. (2014) Kap 2 Konserveringsmetoder. I Nylander, A. Jonsson, L. Marklinder, I. & Nydahl, M. (red.) *Livsmedelsvetenskap*. 2 uppl., Studentlitteratur: Lund. Kap 2 ss 53-54
- Furugren, B (2016). *Livsmedelskemi och matkunskap: Animaliska livsmedel*. Lund: KFS ss 212-214.
- Fernandes, R (red.) (2009). *Microbiology handbook Fish and Seafood*. 2 uppl., Leatherhead: Leatherhead Publishing
- Kaba, N. & Corapci, B. (2014) Effects of Two Different Modified Atmosphere Compositions on Durability of Steam-Cooked Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*, Walbaum, 1792), *Journal of Food Processing & Preservation*, 38(6), ss. 2155–2166. doi:10.1111/jfpp.12195
- Mishra, R. (2022) *Handbook on fish processing and preservation*. 1 uppl., CRC Press.
- RISE (u.å) *Så ska vi äta för att hålla oss friska*.
<https://www.ri.se/sv/berattelser/sa-ska-vi-ata-for-att-halla-oss-friska> [2024-02-23]
- Ozogul, Y., Ozogul, F & Kuley, E. (2006). Effect of modified atmosphere packaging on fish and fish products. *SU URUNLERI DERGISI*, 23, ss.193-200.

8. Bilagor

8.1 Bilaga 1: Kylkalibrering

Kalibrering av kyl som användes för lagring. Termometer kalibrerades innan användning.

Tidpunkt	Temperatur °C	Medeltemp °C	Stdavv
9:00	7.2	7.4	0.3
10:00	7.4		
11:00	7.6		
12:00	7.3		
13:00	7.8		
14:00	7		
15:00	7.8		

8.2 Bilaga 2: Provtagning PCA Ej modifierad atmosfär

Förteckning över identifierade kolonier samt beräkning av medelvärden för respektive spädserie och lagringstid. Visas i CFU/g och log CFU/g. Om ej synliga kolonier benämns CFU med TFTC (too few to count). Om över 300 kolonier används benämning TMTC (too many to count).

Typ	ID	Lagringstid	Spädserie	Replikat	CFU	CFU/g	CFU/g (log)	Medel spädserie (CFU/g)	Medel spädserie (log)	Medel lagringstid (CFU/g)	Medel lagringstid (log)
EJMAP	EJMAP3	3	0	A	TFTC						
				B	TFTC						
			-1	A	TFTC						
				B	TFTC						
			-2	A	TFTC						
				B	TFTC						
			-3	A	TFTC						
				B	TFTC						
			-4	A	TFTC						
				B	TFTC						
			-5	A	TFTC						
				B	TFTC						
			-6	A	TFTC						
				B	TFTC						
	-7	A	TFTC								
		B	TFTC								
	EJMAP5	5	0	A	TFTC						
				B	TFTC						
			-1	A	TFTC						
				B	TFTC						
-2			A	TFTC							
			B	TFTC							

EJMAP3	7	-3	A	TFTC					
			B	TFTC					
		-4	A	TFTC					
			B	TFTC					
		-5	A	TFTC					
			B	TFTC					
		-6	A	TFTC					
		B	TFTC						
	-7	A	TFTC						
		B	TFTC						
	0	A	TFTC						
		B	TFTC						
	-1	A	TFTC						
		B	TFTC						
-2	A	TFTC							
	B	TFTC							
-3	A	TFTC							
	B	TFTC							
-4	A	TFTC							
	B	TFTC							
-5	A	TFTC							
	B	TFTC							
-6	A	TFTC							
	B	TFTC							
-7	A	TFTC							
	B	TFTC							

8.3 Bilaga 3: Provtagning PCA Modifierad atmosfär

Förteckning över identifierade kolonier samt beräkning av medelvärden för respektive spädserie och lagringstid. Visas i CFU/g och log CFU/g. Om ej synliga kolonier benämns CFU med TFTC (too few to count). Om över 300 kolonier används benämning TMTC (too many to count).

Typ	ID	Lagringstid	Spädserie	Replikat	CFU	CFU/g	CFU/g (log)	Medel spädserie (CFU/g)	Medel spädserie (log)	Medel lagringstid (CFU/g)	Medel lagringstid (log)		
MAP	MAP8	8	0	A	2	200	2.30	300	2.48	300	2.48		
				B	4	400	2.60						
			-1	A	TFTC								
				B	TFTC								
			-2	A	TFTC								
				B	TFTC								
			-3	A	TFTC								
				B	TFTC								
			-4	A	TFTC								
				B	TFTC								
			-5	A	TFTC								
				B	TFTC								
			-6	A	TFTC								
				B	TFTC								
	-7	A	TFTC										
		B	TFTC										
	MAP10	10	0	A	TFTC						755000	5.09	
				B	TFTC								
			-1	A	10	10000	4.00	10000	4.00				
				B	TFTC								
-2			A	TFTC									
			B	TFTC									
-3	A	TFTC											

			B	TFTC								
			-4	A	1	100000	6.00		1500000			
				B	2	200000	6.30				6.18	
			-5	A								
				B								
			-6	A								
				B								
			-7	A								
				B								
			0	A								
				B								
			-1	A	22	22000	4.34		22000			
				B							4.34	
			-2	A	2	20000	4.30		20000			
				B							4.30	
			-3	A								
				B								
			-4	A								
				B								
			-5	A								
				B								
			-6	A								
				B								
			-7	A								
				B								
	MAP3	12								21000		4.32

8.4 Bilaga 4: Provtagning VRBD Ej modifierad atmosfär

Förteckning över identifierade kolonier samt beräkning av medelvärden för respektive spädserie och lagringstid. Visas i CFU/g och log CFU/g. Om ej synliga kolonier benämns CFU med TFTC (too few to count). Om över 300 kolonier används benämning TMTC (too many to count).

Typ	ID	Lagringstid	Spädserie	Replikat	CFU	CFU/g	CFU/g (log)	Medel spädserie (CFU/g)	Medel spädserie (log)	Medel lagringstid (CFU/g)	Medel lagringstid (log)	
EJMAP	EJMAP3	3	0	A	TFTC							
				B	TFTC							
			-1	A	TFTC							
				B	TFTC							
			-2	A	TFTC							
				B	TFTC							
			-3	A	TFTC							
				B	TFTC							
			-4	A	TFTC							
				B	TFTC							
			-5	A	TFTC							
				B	TFTC							
	-6	A	TFTC									
		B	TFTC									
	-7	A	TFTC									
		B	TFTC									
	EJMAP5	5	0	A	TFTC							
				B	TFTC							
			-1	A	TFTC							
				B	TFTC							
			-2	A	TFTC							
				B	TFTC							

EJMAP7	7	-3	B	TFTC						
		A	TFTC							
		B	TFTC							
		A	TFTC							
		B	TFTC							
		A	TFTC							
		B	TFTC							
		A	TFTC							
		B	TFTC							
		A	TFTC							
		B	TFTC							
		A	TFTC							
		B	TFTC							
		0	A	TFTC						
	B	TFTC								
	-1	A	TFTC							
	B	TFTC								
	-2	A	TFTC							
	B	TFTC								
	-3	A	TFTC							
	B	TFTC								
	-4	A	TFTC							
	B	TFTC								
	-5	A	TFTC							
	B	TFTC								
	-6	A	TFTC							
	B	TFTC								
	-7	A	TFTC							
B	TFTC									

8.5 Bilaga 5: Provtagning VRBD Modifierad atmosfär

Förteckning över identifierade kolonier samt beräkning av medelvärden för respektive spädserie och lagringstid. Visas i CFU/g och log CFU/g. Om ej synliga kolonier benämns CFU med TFTC (too few to count). Om över 300 kolonier används benämning TMTC (too many to count).

Typ	ID	Lagringstid	Spädserie	Replikat	CFU	CFU/g	CFU/g (log)	Medel spädserie (CFU/g)	Medel spädserie (log)	Medel lagringstid (CFU/g)	Medel lagringstid (log)		
MAP	MAP8	8	0	A	TFTC								
				B	TFTC								
			-1	A	TFTC								
				B	TFTC								
			-2	A	TFTC								
				B	TFTC								
			-3	A	TFTC								
				B	TFTC								
			-4	A	TFTC								
				B	TFTC								
			-5	A	TFTC								
				B	TFTC								
	-6	A	TFTC										
		B	TFTC										
	-7	A	TFTC										
		B	TFTC										
	MAP10	10	0	A	12	1200	3.08		1200				
				B	TFTC					3.08			
			-1	A	TFTC								
				B	TFTC								
			-2	A	TFTC							1200	3.08
				B	TFTC								
	-3	A	TFTC										

MAP12	12		B	TFTC						
			A	TFTC						
		-4	B	TFTC						
			A	TFTC						
		-5	B	TFTC						
			A	TFTC						
		-6	B	TFTC						
			A	TFTC						
		-7	B	TFTC						
			A	TFTC						
		0	B	TFTC						
			A	TFTC						
		-1	B	TFTC						
			A	TFTC						
	-2	B	TFTC							
		A	TFTC							
	-3	B	TFTC							
		A	TFTC							
	-4	B	TFTC							
		A	TFTC							
	-5	B	TFTC							
		A	TFTC							
	-6	B	TFTC							
		A	TFTC							
	-7	B	TFTC							

8.6 Bilaga 6: Mätning av pH-värde Ej modifierad atmosfär

Förteckning över uppmätta pH-värden av prov i EJMAP samt beräkning av medelvärde och standardavvikelse.

Lagringstid	ProvID	Replikat	pH	pH/ProvID	pH/lagringstid	Standardavvikelse
EJMAP 3 3 dagar	A	1	N/A	N/A	N/A	N/A
		2	N/A			
		3	N/A			
		4	N/A			
	B	1	N/A	N/A		
		2	N/A			
		3	N/A			
		4	N/A			
EJMAP 5 5 dagar	A	1	6.69	6.7175	6.70	0.05
		2	6.76			
		3	6.67			
		4	6.75			
	B	1	6.63	6.685		
		2	6.69			
		3	6.67			
		4	6.75			
EJMAP 7 7 dagar	A	1	6.51	6.595	6.56	0.07
		2	6.65			
		3	6.64			
		4	6.58			
	B	1	6.42	6.515		
		2	6.52			
		3	6.57			
		4	6.55			

8.7 Bilaga 7: Mätning av pH-värde i Modifierad atmosfär

Förteckning över uppmätta pH-värden av prov i EJMAP samt beräkning av medelvärde och standardavvikelse.

Lagringstid	ProvID	Replikat	pH	pH/ProvID	pH/lagringstid	Standardavvikelse
MAP 8 8 dagar	A	1	6.46	6.4875	6.43	0.06
		2	6.49			
		3	6.52			
		4	6.48			
	B	1	6.33	6.38		
		2	6.41			
		3	6.39			
		4	6.39			
MAP 10 10 dagar	A	1	6.4	6.4475	6.48	0.05
		2	6.43			
		3	6.48			
		4	6.48			
	B	1	6.45	6.51		
		2	6.52			
		3	6.52			
		4	6.55			
MAP 12 12 dagar	A	1	6.39	6.4425	6.46	0.04
		2	6.44			
		3	6.46			
		4	6.48			
	B	1	6.43	6.48		
		2	6.49			
		3	6.51			
		4	6.49			
MAP 14 14 dagar	A	1	6.58	6.5175	6.53	0.05
		2	6.48			
		3	6.54			
		4	6.47			
	B	1	6.51	6.5325		
		2	6.46			
		3	6.55			
		4	6.61			

8.8 Bilaga 8: Beräkningar

Vidare beskrivs de olika beräkningar som användes vid och efter provtagning.

1. Beräkning av CFU/g och log10

$$(\text{Antalet kolonier} * 10^{\text{spädfaktor}}) / \text{Applikationsvolym} = \text{CFU/g}$$

2. Beräkning av medelvärden

$$(\text{Replikat 1} + \text{Replikat 2}) / 2 = X$$

$$(\text{Medelvärde spädserie -1} + \text{Medelvärde spädserie -2} + \text{Medelvärde spädserie -X}) / \text{Antal spädserier} = \text{Medelvärde provID}$$

3. Beräkning av standardavvikelse från medelvärdet

- a. σ är standardavvikelsen, N är antalet observationer i datamängden, x_i är varje enskild observation och μ är medelvärdet av datamängden.

$$\sigma = \sqrt{[(1/N) * \sum(x_i - \mu)^2]}$$

4. T-test för beräkning av statistisk signifikans

- a. Används för att avgöra om det finns en signifikant skillnad mellan medelvärdena för två grupper.
- b. t är t-värdet, \bar{X}_1 och \bar{X}_2 är medelvärdena för grupp 1 och grupp 2, s^2 är den kombinerade standardavvikelsen för de två grupperna, n_1 och n_2 är antalet observationer i de två grupperna.

$$t = (\bar{X}_1 - \bar{X}_2) / (s^2 \sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)})$$