



Högskolan  
Kristianstad

Högskolan Kristianstad  
291 88 Kristianstad  
044 250 30 00  
[www.hkr.se](http://www.hkr.se)

**Självständigt arbete (examensarbete), 15 hp, för  
Kandidatexamen i mat-och måltidsvetenskap  
VT 2020  
Fakulteten för naturvetenskap**

# **Jämförelse av olika konserveringsmedel genom belastningstest i ett flytande livsmedel**

**Elna Crona & Nathalie Johnsson**

**Författare**

Elna Crona och Nathalie Johnsson

**Titel**

Jämförelse av olika konserveringsmedel genom belastningstest i ett flytande livsmedel.

**Engelsk titel**

Comparison of different preservatives by challenge testing in liquid food.

**Handledare**

Betty Collin

**Examinator**

Arwa Mustafa

**Sammanfattning****Inledning**

En tredjedel av den mat som produceras i världen slängs (United Nations Development Programme [UNDP], 2020) och de livsmedelsförstörande mikroorganismerna är ett vanligt förekommande problem och en bidragande orsak till det globala matsvinnet (Snyder & Worobo, 2018). Livsmedelsindustrin använder därför olika hurdletekniker för att minimera risken för tillväxt av förskämningsorganismer (Snyder & Worobo, 2018). En strategi för att kontrollera om olika hurdletekniker uppfyller sitt syfte är att utsätta ett livsmedel för ett belastningstest.

**Syfte**

Syftet med studien var att genom ett belastningstest i ett flytande livsmedel jämföra konserveringsmedlen lingonjuice och kaliumsorbat + natriumbensoat samt att undersöka produktens fysikaliska och kemiska förändringar över tid.

**Material och metod**

Ett flytande livsmedel (n = 73 å 180 ml) inokulerades i ett belastningstest med log 2–3 mikroorganismer per ml livsmedel. Därefter tillsattes konserveringsmedlen lingonjuice (n = 24) eller kaliumsorbat + natriumbensoat (n = 25). En tredjedel av proverna (n = 24) lämnades utan konserveringsmedel. Provtagning för analys av tillväxt, färg, pH och viskositet (mPas) utfördes vid 0, 14 och 30 dagar efter livsmedlet inokulerats med mikroorganismer.

**Resultat**

Resultatet visade mikrobiell tillväxt i samtliga livsmedel vid dag 0. Dag 14 identifierades tillväxt i livsmedlet med kaliumsorbat + natriumbensoat samt lingonjuice. Vid analysen på dag 30 identifierades tillväxt i livsmedlet med kaliumsorbat + natriumbensoat och i livsmedlet utan konserveringsmedel. Över tiden skedde även fysikaliska förändringar i viskositet och kemiska förändringar av pH-värdet. Gällande färg skedde enbart marginella förändringar.

**Slutsats**

Resultatet av belastningstestet visade att lingonjuice är det konserveringsmedel som har bäst effekt med avseende på produktstabilitet genom att hämma tillväxt av tillsatta mikroorganismer. Resultaten av de fysikaliska mätningarna visade på förändringar över tid med avseende på viskositet. Färg visade enbart minimala förändringar. Resultatet av den kemiska mätningen visade på förändringar av pH-värdet över tid.

**Ämnesord**

"Mikrobiologiskt belastningstest", "matförskämning", "hurdle teknik", "ren etikett", "naturliga konserveringsmedel" och "kemiska konserveringsmedel".

**Author**

Elna Crona and Nathalie Johnsson

**Title**

Comparison of different preservatives by challenge testing in liquid food.

**Supervisor**

Betty Collin

**Examiner**

Arwa Mustafa

**Abstract****Introduction**

One third of food produced in the world is discarded (United Nations Development Program [UNDP], 2020) and food-destroying microorganisms are a common problem and a contributing cause of global food waste (Snyder & Worobo, 2018). The food industry therefore uses various hurdle techniques to minimize the risk of growth of spoilage organisms (Snyder & Worobo, 2018). One strategy to check whether different hurdle techniques meet their purpose is to expose foods in a challenge test.

**Aim**

The aim of the study was to compare the preservatives lingonberry juice and potassium sorbate + sodium benzoate and examine any physical and chemical changes over time through a challenge test on a liquid food product.

**Material and method**

A liquid food ( $n = 73$  á  $180$  ml) was inoculated in a challenge test with log 2-3 microorganisms per ml food. Thereafter preservatives lingonberry juice ( $n = 24$ ) or potassium sorbate + sodium benzoate ( $n = 25$ ) were added. One third of the samples ( $n = 24$ ) were left without preservatives. Sampling for analysis of growth, color, pH and viscosity (mPas) was performed at 0, 14 and 30 days after the food was inoculated with microorganisms.

**Results**

The results showed microbiological growth in all food products at day 0. Day 14 growth were found in the food with potassium sorbate + sodium benzoate and lingonberry juice. By the analysis on day 30 growth in the food with potassium sorbate + sodium benzoate and in the food without preservatives were showed. Over time physical changes of viscosity and chemical changes of pH occurred. Regard to color only marginal changes occurred.

**Conclusion**

The result of the challenge test showed that lingonberry juice is the preservative that has the best effect regard to product stability through inhibiting the added microorganisms. The results of the physical measurements showed changes regard to viscosity over time. Color only showed marginal changes. The result of the chemical measurement showed changes of pH over time.

**Keywords**

“Microbiological challenge testing”, “food spoilage”, “hurdle technology”, “clean label”, “natural preservatives” and “chemical preservatives”.

## Ordförklaringar och förkortningar

**Apatogen** - Icke sjukdomsframkallande. Motsatsen till patogen.

**Att inokulera** - Att tillsätta mikroorganismer till ett livsmedel.

**BHI - buljong** - Brain heart infusion – odlingsbuljong för mikroorganismer.

**CFU** - Colony forming units. Koloniformande enheter av mikroorganismer (celler alternativt sporer).

**Dag 0** – Innebär för denna studie den dag då belastningstestet inleddes. Alltså, den dag då mikroorganismer och de olika konserveringsmedlen tillsattes livsmedlet.

**DG18** - Dichloran Glycerol agar. Odlingsmedium för mikroorganismer.

**Hurdles** - Hinder. En teknik där olika faktorer kombineras såsom temperatur, pH-värde och vattenaktivitet ( $a_w$ ) för att minimera oönskad mikrobiell tillväxt.

**Hyfala filament** – En tunn trådliknande cellstruktur som bygger upp en svamp.

**Icke-selektiv näringsbuljong/agar** - Ett odlingsmedium som inte gynnar någon specifik mikroorganism.

**Inokulum** - Cellsuspension.

**Konserveringsmedel** - En tillsats till livsmedel som har en konserverande effekt. Här; Natriumbensoat, kaliumsorbit samt lingonjuice (bensoesyra).

**MALDI-TOF** - Förkortning av “Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight”. En form av masspektrometri som identifierar arter av mikroorganismer mot en databas innehållande information om olika mikroorganismers genetik.

**MEA** - Malt extract agar. Odlingsmedium.

**OD** - Optical Density. Optisk täthet. Mäter ljusets hastighet genom ett ämne, påverkas främst av en given ljusvågs våglängd.

**Pepton 0,1 %** - En lösning av pepton i destillerat vatten, vilket används som spädningsmedel vid utspädning av prov.

**Processvalidering** - Utvärdering av ett processflöde i en produktion.

**TGE** - Tryptone glucose extract agar. Odlingsmedium för mikroorganismer.

**Virulens** - Giftighet, toxicitet.

## Innehåll

Förord.....	6
Inledning .....	7
Syfte .....	8
Frågeställningar.....	8
Bakgrund.....	9
Experimentell design vid genomförande av belastningstest.....	9
Val av mikroorganismer till belastningstestet .....	11
Svårigheter vid utförande av belastningstest .....	12
Naturliga E-nummer och ”clean label” .....	13
Konserveringsmedlets betydelse .....	14
Den mikrobiella tillväxtens påverkan i ett livsmedel .....	16
Material och metod .....	16
Datainsamling .....	16
Material .....	17
Metod för mikrobiologiska tester .....	17
Isolering av <i>C. cladosporioides</i> , <i>R. stolonifer</i> och <i>K. marxianus</i> .....	17
Isolering av <i>L. plantarum</i> .....	17
Koncentrationsbestämning av <i>C. cladosporioides</i> , <i>R. stolonifer</i> , <i>K. marxianus</i> och <i>L. plantarum</i> .....	18
Pilotförsök.....	18
Provberedning .....	21
Beredning och tillsättning av konserveringsmedel.....	21
Beredning och tillsättning av suspension .....	21
Provtagningar .....	21
Mikrobiell provtagning .....	21
Fysikaliska och kemiska mätningar .....	22
Statistiska metoder .....	23
Etiska överväganden .....	23
Resultat .....	24
Pilotförsök.....	24
Belastningstest .....	25
Fysikaliska och kemiska förändringar.....	28
Diskussion.....	32
Resultatdiskussion.....	32
Mätning av fysikaliska och kemiska egenskaper .....	33
Bortfallsanalys .....	36
Metoddiskussion .....	37
Relevans för huvudområdet mat- och måltidsvetenskap .....	40
Slutsats .....	41
Referenser .....	42
Bilaga 1. Laboration med <i>L. plantarum</i> ; förvaring i anaerobklocka och i aerob miljö .....	47
Bilaga 2. Metod för skördning av mögel.....	48

## Förord

Vi vill inleda rapporten för vårt examensarbete med att rikta ett stort tack till vår handledare Betty Collin. Utan ditt tålamod och engagemang hade vi aldrig kommit i mål. Likaså vill vi vända oss till Rickard Albin och Karin Helmersson för att tacka er för det stöd som ni bidragit med under denna arbetsprocess. Vi har lärt oss otroligt mycket tack vare att vi gavs förtroendet att ta oss an detta projekt.

Båda författarna av detta examensarbete finner ett stort intresse i det mikrobiologiska arbetet kring livsmedel. Det föll sig därför naturligt att examensarbetet skulle behandla just detta. Studien inleddes redan hösten 2019 i samband med ett VFU-projekt hos Lyckeby Culinar AB, vilket syftade till framtagning av metoden för belastningstestet. Projektet fortlöpte i samband med examensarbetet där studien gått ut på att följa den framtagna metoden. De metoder som syftar till belastningstestet har kortats ner och förenklats i rapporten på grund av sekretess. Mer utförliga metodbeskrivningar har delgivits vår uppdragsgivare Lyckeby Culinar AB.

Examensarbetet har inneburit både laborativa arbetsmoment och sammanställning av denna rapport. Elna Crona och Nathalie Johnsson har tillsammans genomfört detta arbete utan några särskilda fördelningar av huvudansvaret. Det har varit en gemensam process där vi båda engagerat oss lika mycket.

Tack för ett bra samarbete kompis, detta klarade vi galant!

## Inledning

I takt med att världens befolkning ökar ställs högre krav på utnyttjandet av jordens land- och havsresurser (Adams, Moss och McClure, 2016). Om världens livsmedelsförsörjning ska fortsätta öka i den takt som populationen, då menar Adams et al. (2016) att en minskning måste ske av de förluster som uppstår innan och efter skörd av råvaror. Faktum är att en tredjedel av den mat som produceras i världen slängs, vilket betyder att en minskning av sådana förluster kunnat bidra till att förse jordens befolkning med mat (United Nations Development Programme [UNDP], 2020; Adams et al., 2016).

Ett av de globala målen (nr 12) är inriktat mot hållbar konsumtion och produktion och att det till 2030 ska skett en halvering av det globala matsvinnet (UNDP, 2020). Detta syftar till matsvinnet längs med hela livsmedelskedjan, samt de förluster som uppstår efter skörd. De livsmedelsförstörande mikroorganismerna är ett vanligt förekommande problem och en bidragande orsak till det globala matsvinnet (Snyder & Worobo, 2018). Med andra ord är det mikrobiologiska arbetet ett viktigt bidrag till att minska matsvinnet (Adams et al., 2016).

Den mikrobiella kvaliteten av ett livsmedel inkluderar förekomst av önskvärda, frånvaro av sjukdomsframkallande samt livsmedelsförstörande mikroorganismer (Beck-Friis, Bruce, Cederholm, Danielsson-Tham, & Lundström, 2013). Livsmedelsindustrin anpassar därför bearbetnings- och förpackningsstrategier av livsmedel för att minimera risken för tillväxt av förskämningsoorganismer (Snyder & Worobo, 2018). Ett verktyg är att nyttja hurdletekniker för att minimera risken för tillväxt av oönskade mikroorganismer (Sangma et al., 2019). Att kombinera olika tekniker som motverkar mikrobiell tillväxt kallas "hurdle effekt" och ger en större sammantagen motståndskraft mot de oönskade mikroorganismerna (Singh & Shalini, 2016). Exempelvis kan livsmedelsindustrin utnyttja höga och låga temperaturer, konkurrerande mikroorganismer och/eller tillsatser av konserveringsmedel (Sangma et al., 2019).

Enligt Livsmedelsverket (2020) finns idag ett fyrtiotal godkända konserveringsmedel för livsmedel. Varje konserveringsmedel fyller en funktion och tillsätts för att skapa mikrobiell livsmedelssäkerhet samt för att öka hållbarheten.

Protokollet "*Microbiological challenge testing*" som tagits fram av Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety (2003) beskriver en strategi för att kontrollera om olika hurdletekniker uppfyller sitt syfte. Strategin innebär att genomföra

belastningstest där produkten utsätts för relevanta mikroorganismer och utvärderas kring eventuell tillväxt.

I denna studie undersöktes en ekologisk flytande produkt med tillsats av två olika konserveringsmedel med hjälp av ett belastningstest. De olika konserveringsmedel som jämfördes var lingonjuice (bensoesyra) och natriumbensoat + kaliumsorbat. Dessa jämfördes med avseende på deras respektive tillväxthämmande effekt på bakterien *Lactobacillus plantarum*, jästsvampen *Kluyveromyces marxianus* samt mögelsvamparna *Cladosporium cladosporioides* och *Rhizopus stolonifer* över tid. Parallellt med belastningstestet dokumenterades produktens fysikaliska förändringar kring färg och viskositet, samt kemiska förändringar i form av pH-värde.

## Syfte

Syftet med studien var att genom ett belastningstest i ett flytande livsmedel jämföra konserveringsmedlen lingonjuice och kaliumsorbat + natriumbensoat samt att undersöka livsmedlets fysikaliska och kemiska förändringar över tid.

## Frågeställningar

- Vilken av de undersökta konserveringsmedlen har bäst effekt med avseende på produktstabilitet?
- Förändras livsmedlet över tid med avseende på färg, pH och viskositet efter tillsats av mikroorganismer och konserveringsmedel?



## Bakgrund

Vid ett belastningstest tillförs produkten mikroorganismer och analyseras därefter över tid för att utvärdera produktens mikrobiologiska säker- och hållbarhet (RISE, u.å). Microbiological challenge testing (2003) beskriver hur ett belastningstest kan användas för att utvärdera processen i en livsmedelsproduktion samt bestämma en produkts hållbarhet. Används ett belastningstest som en del av en processvalidering, kommer enligt Microbiological challenge testing (2003) analysen av den erhållna datan påvisa om processen fungerar som den ska, och därmed resultera i den avdödning av mikroorganismer som är förutbestämd. Vid avvikelser kan justeringar i processen göras, med hjälp av den insamlade datan, för att komma upp i den avdödning som krävs. Ett väl designat belastningstest kan vara till hjälp för att utvärdera produktionsflödet och samtidigt avgöra produktens hållbarhet med avseende tid i livsmedelsbutikerna samt om produkten behöver förvaras kyld eller i rumstemperatur.

### Experimentell design vid genomförande av belastningstest

För att belastningstestet ska vara så likt verkligheten som möjligt menar Spanu et al. (2014) att produkten i testet bör utsättas för de risker som en produkt kan komma att gå igenom efter produktion. Det kan exempelvis handla om variation av temperatur vid transport och oaksam hantering från det att livsmedlet lämnat dagligvaruhandeln. Även Microbiological challenge testing (2003) rekommenderar att livsmedlet förvaras vid lämplig temperatur efter inokulering, och att förvaringen efterliknar verkligheten så mycket som möjligt. Om produkten inte behandlas på ett sätt som är "naturligt" för hur konsumenterna hanterar det, menar Microbiological challenge testing (2003) att relevanta upptäckter kan missas.

Spanu et al. (2014) beskriver hur ett belastningstest går till och vad som bör beaktas vid förberedelser av testet samt under hela testproceduren. Författarna förklarar att stammarna som ska användas bör odlas ut på ett icke-selektivt agar medium och inkuberas under 24 timmar vid 37°C. När mikroorganismerna tillväxt överförs en ren koloni från agarplattan till en icke-selektiv näringsbuljong som exempelvis BHI (brain heart infusion). Buljongen inkuberas sedan över natten för att mikroorganismerna ska öka i koncentration. Att odlingen av mikroorganismer bör ske i BHI-buljong bekräftas även av Uyttendaele et al. (2004). Adams et al. (2016) nämner att DG18 är ett vanligt förekommande medium vid uppodling av mögel. Enligt Livsmedelsverket via

Helmersson (personlig kommunikation, 7 januari 2020) är MEA därefter lämpligt att använda för renodling av mögel.

Innan designen för experimentet fastställs finns det faktorer som bör beaktas. För att belastningstestet ska vara adekvat bör varaktigheten bestämmas efter produktens hållbarhet plus marginal (Microbiological challenge testing, 2003). Detta eftersom det är viktigt att veta vad som händer i produkten om konsumenter använder den efter bäst föredatumet passerat. Även Spanu et al. (2014) fastställer att durationen på ett belastningstest bör vara lika lång som produktens hållbarhet med marginal som innefattar 1,5 gånger hållbarhetstiden. Spanu et al. (2014) understryker även vikten av att utföra analyserna med jämna intervall under hela varaktighetsperioden och konstaterar att mellan fyra och fem analyser ska genomföras över tiden. Enligt Microbiological challenge testing (2003) bör minst fem till sju analyser utföras. Två av dessa analystillfällen bör efter inokulering ske på dag 0 och sista dagen på hållbarheten (Microbiological challenge testing, 2003; Spanu et al., 2014).

Spanu et al. (2014) beskriver att antalet replikat som analyseras inte bör underskrida tre per analystillfälle, och att ett ökat antal replikat vid varje analystillfälle medför en större tillförlitlighet i testet. Förutom att analysera de inokulerade produkterna bör även analyser göras på produkter som inte blivit inokulerade med mikroorganismer. Detta för att kunna detektera naturlig kontaminering från fabriken (Spanu et al., 2014).

För att kunna bestämma koncentrationen av mikroorganismer menar Spanu et al. (2014) att ett pilotförsök bör göras för att bestämma inkubationstiden och att uppräknigen bekräftas genom räkning av kolonier på agarplattor. Spanu et al. (2014) skriver även att beredningen av de stammar som ska tillsättas bör ske separat och blandas ihop till en suspension precis innan inokulering.

Det finns riktlinjer att följa angående hur inokuleringen av mikroorganismer ska ske och Spanu et al. (2014) menar att den inte får ske på ett sätt som förändrar produkten. Detta medför att tillsatsen av mikroorganismer inte bör överskrida 1% av produktens vikt/volym. Enligt Spanu et al. (2014) beror detta på att tillsatsen av mikroorganismer ska vara lik en naturlig kontaminering.

Microbiological challenge testing (2003) beskriver att mängden inokulum som tillsätts produkten avgörs beroende på om syftet med testet är att bestämma produktstabilitet och hållbarhet eller att validera ett steg i produktionsflödet. Vanligtvis rekommenderas en inokuleringsnivå mellan log 2–3 /ml livsmedel för att fastställa livsmedlets stabilitet

(Microbiological challenge testing, 2003). Vidare beskrivs mängden inokulum vid utvärdering av en avdödningsprocess som exempelvis värmebehandling till log 6–7 /ml livsmedel. Den höga nivån av inokulum vid en processvalidering behövs för att kunna demonstrera den avdödningsprocess som krävs.

Det är enligt Microbiological challenge testing (2003) vanligt att använda flera specifika stammar i ett belastningstest, detta för att kunna redovisa potentiell stamvariation. Vidare beskrivs att mikroorganismer tillsätts livsmedlet i form av en suspension och att det inte är ovanligt att tillsätta fem eller fler stammar till livsmedlet samtidigt. Görs testet på en flytande produkt går det enligt Spanu et al. (2014) bra att inokulera mikroorganismer direkt genom det befintliga oblatet, en fast produkt kan doppas eller sprayas med en specifik mängd mikroorganismer.

### **Val av mikroorganismer till belastningstestet**

Vid genomförande av belastningstest väljs vanligtvis flera mikroorganismer ut ifrån olika stammar och tillsätts tillsammans i en suspension (Institute of Food Technologists for the Food and Drug Administration of the U.S. Department of Health and Human Services [FDA], 2000). Hur mikroorganismerna väljs ut beror på ändamålet för belastningstestet. FDA (2000) konstaterar att det finns undantag då inte alla mikroorganismer är lämpliga att använda i lokaler där belastningstestet ska utföras. Anledningen till att ett belastningstest inte ska ske på en livsmedelsanläggning menar Spanu et al. (2014) beror på att kontamination av patogener bör undvikas i största möjliga mån. Om så är fallet ska dessa patogener bytas ut mot så kallade "surrogatmikroorganismer". En surrogatmikroorganism är en stam av den tänkta patogenen som har alla dess egenskaper, men utan dess virulens. De kan istället väljas ut enligt andra kriterier;

- Att mikroorganismen inte är patogen
- Att mikroorganismen är enkel att odla upp i populationer med hög täthet
- Att populationerna är lätträknade och inte kräver dyra verktyg eller program
- Att de är lätta att urskilja

*L. plantarum* är en apatogen fakultativt anaerob mjölksyrabakterie (Thougaard, Varlund & Madsen 2012; Adams et al., 2016). Machielsen et al. (2010) beskriver att bakterien är vanligt förekommande vid fermentering av grönsaker, mjölkprodukter samt kött. Vidare beskrivs att tillväxt sker mellan 25–42°C med en optimumtemperatur på 30°C och den

kan tillväxa vid lågt pH-värde med intervall mellan 3,9–5,6. Enligt Lundquist och Björn (u.å) är *L. plantarum* en bakterie och därmed en prokaryot cell.

*C. cladosporioides* är en vanligt förekommande mögelsvamp runt om hela världen och sporerna hittas vanligen i luft, jord och vatten (Ogórek, Lejman, Pusz, Miłuch, & Miodyńska, 2012). Mögelsvampen tillväxer mellan 0–30°C med ett temperaturoptimum mellan 18–28°C. Den kan tillväxa i en miljö med högt osmotiskt tryck och tillväxer i  $a_w$  mellan 0,900–0,996 (Briceño & Latorre, 2008). Ogórek et al. (2012) beskriver ett optimalt pH-värde för mögeltillväxt på 5,6 och att många mögelsvampar klarar av att växa inom pH 2–9. Enligt författarna framkallar vissa mikroorganismer sjukdomar hos olika grödor och växter. Mögelsvampens kolonier når enligt Ogórek et al. (2012) 3–4 cm i diameter på tio dagar i 20°C på MEA. Enligt Thougard et al. (2012) bildar *C. cladosporioides* små vita kolonier som därefter övergår mellan mörkgrönt och svart.

Enligt Bullerman (2003) är *R. stolonifer* en snabbväxande mögelsvamp med vitt mycel och svarta sporer där de unga sporererna är vita och blir svarta över tid. *Rhizopus*-släktet bildar så kallade stolonier som växer i bågar över ett substrat (Thougard et al. 2012). *R. stolonifer* är vanlig i jord, förekommer även i förorenat vatten samt på frukter med högt vatteninnehåll så som jordgubbar och tomater och är ett vanligt förekommande brödmögel (Thougard et al. 2012; Bullerman, 2003). *R. stolonifer* tillväxer enligt Ladaniya (2008) snabbt vid temperatur runt 15°C och sprider sig fort och kontaminerar närliggande livsmedel. Både *R. stolonifer* och *C. cladosporioides* är eukaryota celler och har större celler än prokaryota mikroorganismer (Lundquist & Björn, u.å).

*K. marxianus* bildar lätt sporer och är en av de få jästarter som kan fermentera laktos och används därför för industriell framställning av laktas (Thougard et al., 2012). Adams et al. (2016) beskriver hur trots att jäst vanligen används vid produktion av fermenterade livsmedel, kan dess biokemiska aktiviteter skapa förskämning i de livsmedel där detta är oönskat. *K. marxianus* är termotolerant och tål upp till 45°C (Rocha, Abrahão-Neto, & Gombert, 2011). Dess temperaturoptimum är 28–27°C och det optimala pH-värdet är 5 (Yanase et al., 2010; Fonseca, Heinzle, Wittmann, & Gombert, 2008).

## **Svårigheter vid utförande av belastningstest**

Det finns svårigheter med att utföra ett belastningstest enligt Spanu et al. (2014) och författarna menar att de som utför ett sådant test bör få experthjälp av en livsmedelsmikrobiolog. Det krävs även en hel del kunskap för att kunna utföra ett sådant

test, och vikten av att testet är rättvisande och pålitligt är stor. Därför menar Spanu et al. (2014) att hjälp från en expert är att föredra för att undvika onödiga misstag.

En svårighet i utförande av ett belastningstest kan enligt Microbiological challenge testing (2003) vara att de mikroorganismer som tillsätts livsmedlet hinner avdödas innan de anpassat sig till den befintliga miljön. Författarna menar att detta kan bero på att inokulationsnivån varit för låg vid tillsättning vilket i sin tur kan leda till missvisande resultat i analysen. Likaså kan inokulationsnivån blivit för hög vilket kan innebära att mängden mikroorganismer blir för hög för processens avdödning. Vid en processvalidering kan alltså resultaten bli missvisande och påvisa att processen inte klarar av att avdöda den mängd mikroorganismer som krävs, trots att den egentligen gör det (Microbiological challenge testing, 2003).

Sutton (2011) beskriver att analyser av provtagningar som sker med hjälp av räkning av CFU kan innebära en viss begränsning då intervallet är relativt smalt. Intervallet som beräknas med hjälp av platträkning ligger mellan 20–200 CFU på en petriskål. Vidare beskrivs begränsningarna gällande en adekvat platträkning, och att CFU på plattor bör räknas i duplikat eller triplikat för att få ett så pålitligt resultat som möjligt. Olika mikroorganismer uppträder olika vid tillväxt vilket kan försvåra avläsningen av CFU (Adams et al., 2016).

## **Naturliga E-nummer och ”clean label”**

På 1960-talet introducerades E-nummersystemet och enligt Saltmarsh (2015) syftade ”E” till att försäkra konsumenter om att tillsatsen var säker att konsumera. Idag råder det en viss skepsis kring tillsatser och enligt van Gunst och Roodenburg (2019) beror detta på att konsumenter associerar de kodade tillsatserna i livsmedel med kemikalier som har negativ påverkan på människors hälsa.

Saltmarsh (2015) beskriver att den negativa bilden av tillsatser härrör från den så kallade ”Villejuif-listan” vars ursprung påstod komma från ett sjukhus i Frankrike på 1980-talet. Där identifierades tillsatser bland annat som cancerframkallande. Till exempel ansågs citronsyra som en av de farligaste tillsatserna. Listan visade sig enligt Saltmarsh (2015) vara falsk, men ryktet om farliga tillsatser spred sig globalt till organisationer och konsumenter. Enligt van Gunst och Roodenburg (2019) beskriver konsumenter E-nummer som onaturliga, artificiella och ohälsosamma, vilket resulterar i att allt fler inhandlar livsmedel som är ”naturliga” och utan E-nummer.

Trenden rör sig enligt Saltmarsh (2015) bort från E-nummer mot en trend som kallas för “clean label” eller “ren etikett”. Saltmarsh (2015) skriver att det inte finns någon överenskommen definition av termen “ren etikett”, men kan generellt beskrivas som att livsmedelsetiketter ska vara “rena” och utan kodning. Deklarering av tillsatser på etiketten ska alltså inte kunna tolkas av konsument som konstgjorda eller kemiska.

Livsmedelsföretagen följer trenden och enligt Saltmarsh (2015) finns det forskning som visar på att 58% män respektive 74% kvinnor i Europa och USA läser etiketterna när de inhandlar livsmedel, vilket kan förklara varför livsmedelsföretagen märker sina livsmedel med exempelvis “färre E-nummer”, “100% naturliga ingredienser” eller “utan tillsatser”. Dessa märkningar förmedlar enligt van Gunst och Roodenburg (2019) en negativ bild av E-nummer. Trots märkningar på livsmedelsetiketter skiljer inte lagstiftningen mellan naturliga och artificiella E-nummer (van Gunst och Roodenburg, 2019).

Precis som Saltmarsh (2015) nämner även van Gunst och Roodenburg (2019) att “E” står för “säkert” och alla tillsatser som idag tillsätts livsmedel är godkända av EU-kommissionen och European Food Safety Authority (EFSA). Reglerna för att en tillsats ska bli godkänd är enligt Livsmedelsverket (2019c) strikta. De skriver vidare att det inte enbart räcker att tillsatsen undersöks och testas av ett företags egen forskningsenhet, utan alla EU-medlemsländer, EU-kommissionen samt EFSA är inblandade i en tillsats godkännande.

## **Konserveringsmedlets betydelse**

Mögel, jäst och bakterier är vanligt förekommande mikroorganismer som förstör livsmedel under lagringsperioden och en del mögelarter bildar toxiner vid tillväxt. Enligt Livsmedelsverket (2019a) benämns mögelgifter som mykotoxiner. *Penicillium* och *Aspergillus* är två mögelsläkten som bildar mykotoxiner vid tillväxt och i Norden är det vanligt att exempelvis spannmål är kontaminerat med svamparter av *Fusarium*, som bildar mykotoxinet trihotecener (Livsmedelsverket, 2019a).

Mögelgifter i maten kan enligt Livsmedelsverket (2019b) ge negativa hälsoeffekter. Effekterna kan både vara akuta och ge upphov till exempelvis magsjuka, men de kan också resultera i sjukdom som uppstår efter en längre tid (till exempel lever- och njurskador samt cancer).

Enligt Folkhälsomyndigheten (2016) delas livsmedelsburen smitta upp i två olika grupper, infektion och förgiftning, och beskriver skillnaden så här:

**Infektion:** “Maten innehåller mikroorganismer eller parasiter som från mag-och tarmkanalen tränger in i tarmväggen och orsakar inflammation (till exempel *Salmonella*, Enterohemorragisk *E. coli* (EHEC) *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Cryptosporidium* och Calicivirus).” (Folkhälsomyndigheten, 2016)

**Förgiftning:** “Maten blir förorenad av framför allt bakterier som vid sin tillväxt bildar bakteriegifter (toxiner). Vissa förorenande mikroorganismer kan också via sina egna enzymer omvandla till exempel proteiner i livsmedlet till toxiska produkter.” (Folkhälsomyndigheten, 2016)

Behandlas inte livsmedel med olika hurdletekniker är risken större att konsumenten blir drabbad av infektion eller förgiftning via maten. Det är alltså inte enbart av hållbarhetskäl som konserveringsmedel används, utan som också nämnts tidigare för att säkra livsmedel för konsumenter så att risken för infektion och förgiftning minimeras.

Produkten som analyserades i detta examensarbete har låg vattenaktivitet (0,81), hög salthalt (15,8%) samt lågt pH-värde (3,82). Vanligt förekommande förskämningorganismer i denna miljö är mögel, jäst och bakterier. De konserveringsmedel som tillsattes produkten (kaliumsorbat + natriumbensoat) valdes för att de är verksamma mot jäst, mögel och bakterier i en sur miljö. Kaliumsorbat är verksamt i svagt sur miljö till sur miljö och natriumbensoat är verksamt endast i sur miljö (Livsmedelsverket, 2015a; Livsmedelsverket 2015b).

Trots att en del konserveringsmedel kan framställas naturligt så framställs det ofta syntetiskt. Bensoesyra är ett konserveringsmedel som finns naturligt i bär, framförallt i lingon, tranbär och hjortron och är, precis som natriumbensoat, endast verksamt i sura miljöer och effektivt mot jäst, mögelsvampar och vissa bakterier (Livsmedelsverket, 2015c). Eftersom det enligt Saltmarsh (2015) råder en skepsis kring kodade konserveringsmedel (E-nummer) och konsumenters intresse över naturliga ingredienser tillsattes lingonjuice bestående av bensoesyra (Lyckeby Culinar AB, bär plockade i Värmland) till en tredjedel av de produkter som analyseras. Detta för att jämföra naturligt framställt konserveringsmedel gentemot syntetiskt framställt konserveringsmedel med liknande verksamma funktion.

Hur ett konserveringsmedel framställs ger inte någon skillnad med avseende på funktionalitet (Livsmedelsverket, 2013). Oavsett om ett konserveringsmedel framställs naturligt genom utvinning från exempelvis bär, eller om det framställs syntetiskt i ett laboratorium påverkar inte märkningen. Eftersom det inte framgår av märkningen hur ett

konserveringsmedel är framställt kan konsumenter med oro över detta gå in på livsmedelsverkets hemsida och klicka vidare till funktionen ”sök E-nummer” (Livsmedelsverket, u.å). Där listas alla godkända tillsatser och ger förklaring på dess funktionalitet i livsmedlet samt huruvida det kan framställas naturligt och/eller syntetiskt.

## **Den mikrobiella tillväxtens påverkan i ett livsmedel**

Adams et al. (2016) beskriver att förruttelse av ett livsmedel bland annat kan bero på skadeinsekter, uttorkning, föråldring och härskning. Övervägande förskämning sker dock på grund av mikroorganismer och kan yttra sig på olika sätt eller i kombination berättar Adams et al. (2016) vidare. Mikrobiell påverkan kan vara synlig i form av slem, bakterietillväxt eller degradering av livsmedlets struktur och textur. Vanligast yttrar sig den mikrobiella tillväxten genom att doft och smak avviker på grund av kemiska produkter från den mikrobiella metabolismen.

Enligt Microbiological challenge testing (2003) är det viktigt att vid ett belastningstest förstå vilka faktorer som påverkar produktens mikrobiologiska stabilitet. Författarna skriver vidare att inre faktorerna som pH-värde,  $a_w$  eller konserveringsnivå kan vara nyckeln till att förhindra tillväxt av patogener, eller för att förhindra förskämningsorganismer som skulle kunna påverka produktens säkerhet under dess avsedda hållbarhet. Därför är det enligt Microbiological challenge testing (2003) viktigt att följa inre faktorer vid ett belastningstest. Förändring som sker bör även dokumenteras i varje studie för framtida jämförelse och referens. Denna studie har således förenklats och kommer enbart utföra mätningar på pH-värdet.

## **Material och metod**

### **Datainsamling**

Artiklarna som använts som referensmaterial har inhämtats via Summon och Google Scholar med “referentgranskning” som filter för tillhandahållande av vetenskapliga artiklar med god standard och objektivitet. Myndigheter och organisationers hemsidor har bidragit med relevant information för att styrka argument och tidigare kurslitteratur har använts som stöd. De sökord som använts för att återfinna korrekt information har varit “Microbiological challenge testing”, “food spoilage”, “hurdle technology”, “clean label”, “natural/unnatural” och “preservatives”.



## Material

Undersökningsmaterialet har bestått av ett flytande livsmedel (180 ml) med ett pH-värde på 3,8,  $a_w$  0,81 och 15,8% salthalt (Helmersson, personlig kommunikation, 7 maj 2020). Därefter har två olika konserveringsmedel tillsatts. Ursprungsprodukten som inte inokulerades var inte en del av studien utan används enbart som referens för pH,  $a_w$  och salthalt.

**Tabell 1.** Livsmedlets tillsats och antal flaskor (n).

Konserveringstillsats	(n)
Lingonjuice	24
Kaliumsorbat + natriumbensoat	25
Inga	24

## Metod för mikrobiologiska tester

Innan analysen kunde börja var det nödvändigt att genomföra laborativt arbete för isolering och koncentrationsbestämning av mikroorganismer (figur 2). Det laborativa arbetet bestod även av pilotförsök för att kunna optimera metoden innan försöket påbörjades.

### Isolering av *C. cladosporioides*, *R. stolonifer* och *K. marxianus*

Provberedningen av den frystorkade kulturblandningen i glasvialen (Livsmedelsverket, RM Food 2019:7) utfördes enligt beskrivningen från Livsmedelsverket (2019d). En spädningsserie genomfördes och 100  $\mu$ l spreds ut på DG18 och MEA plattor vilka sedan inkuberades i  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$  under sex dygn. Därefter utfördes en renodling för varje art till nya MEA plattor. *C. cladosporioides* och *R. stolonifer* verifierades med hjälp av mikroskopering. *K. marxianus* verifierades med hjälp av MALDI-TOF.

Kulturen innehöll inledningsvis även *Penicillium verrucosum* vilken uteslöts ur studien på grund av bildandet av Ochratoxin A och därmed dess olämplighet i skolmiljö.

### Isolering av *L. plantarum*

Uppodling av *L. plantarum* utfördes efter inköp av fruktdrycken hallon och granatäpple från varumärket ProViva. Ett utstryk utfördes direkt från förpackningen till agarplattor vilka sedan inkuberades i  $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$  under tre dygn. Därefter löstes kolonier i BHI-

buljong. *L. plantarum* och *K. marxianus* verifierades kontinuerligt under isolering med hjälp av MALDI-TOF.

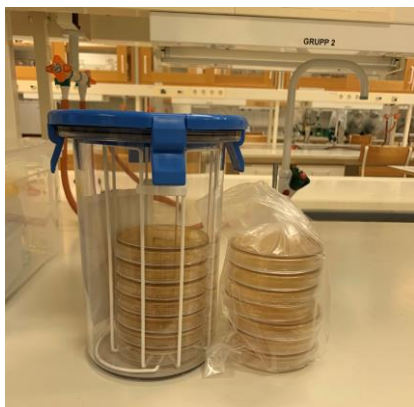
## **Koncentrationsbestämning av *C. cladosporioides*, *R. stolonifer*, *K. marxianus* och *L. plantarum***

För koncentrationsbestämning av *K. marxianus* respektive *L. plantarum* genomfördes en mätning av OD och en 1:10 spädningsserie i pepton (0,1%) varav 100 µl spreds ut på MEA plattor, vilka sedan förvarades i  $16 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  under åtta dygn. Avläsning av *K. marxianus* och *L. plantarum* skedde genom att räkna CFU och därefter beräkning av koncentration per ml. Avläsning av *C. cladosporioides* och *R. stolonifer* skedde med hjälp av Bürkerkammare. Inför dag 0 utfördes en renodling av *C. cladosporioides* och *R. stolonifer* till MEA plattor.

## **Pilotförsök**

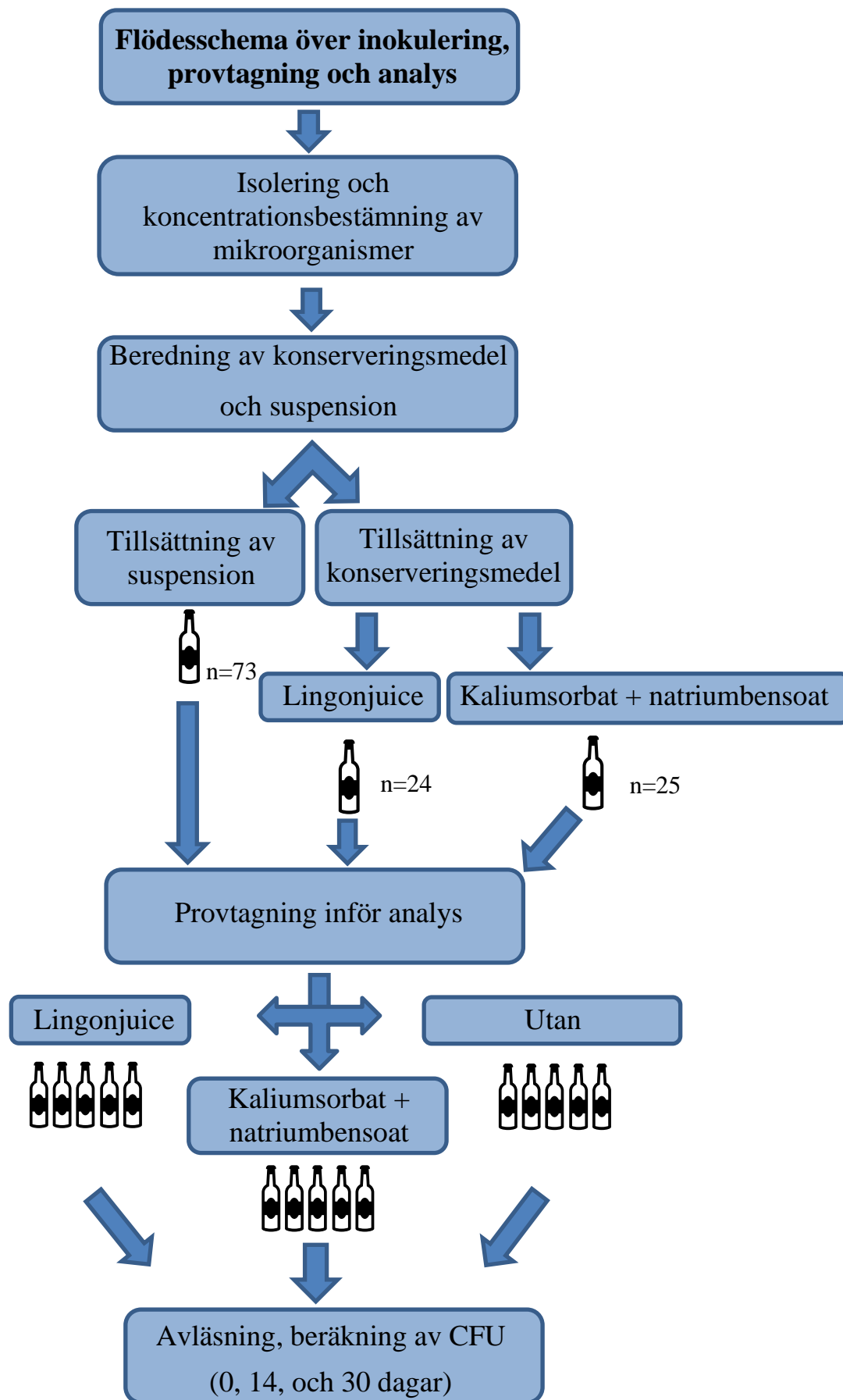
Nedan presenteras kort de olika pilotförsök som genomfördes inför inokulering.

- Materialet som var tilltänkt att användas i studien testades. Detta innefattade membranets förmåga att fästa, kanylens förmåga att suga upp det flytande livsmedlet med hjälp av en 10 ml spruta och möjligheten för avläsning av 400 µl i sprutan. Membranet skulle fästas i förpackningens mynning ovanpå det befintliga oblatet för att skapa en så syrefri miljö som möjligt.
- Då *L. plantarum* är fakultativt anaerob (Adams et al., 2016) utfördes en laboration för att fastställa om anaerobklockor för anaerob odling behövde användas i studien (se bilaga 1).



**Figur 1.** Visar till vänster anaerobklocka som användes i pilotförsöket. Till höger syns de plattor som placerades i en aerob miljö. Fotograf: Nathalie Johnsson

- Mikroorganismernas tillväxthastighet testades genom inkubering i olika temperaturer och antal dagar.
- För att säkerställa att rätt mängd mikroorganismer tillsattes i produkten gjordes ett test för att prova vilken metod som var mest lämplig för koncentrationsbestämning av *C. cladosporioides* och *R. stolonifer*. De metoder som jämfördes var Bürkerkammare och OD-mätning.



**Figur 2.** Visar ett flödesschema över inokulering, provtagning och analys.

## Provberedning

Samtliga flaskor (n = 73) med det flytande livsmedlet förbereddes dag 0 med avsedda membran för förslutning av produkten. Detta för att skapa en så syrefri miljö som möjligt trots punktering av oblatet som försluter produkten.

## Beredning och tillsättning av konserveringsmedel

Dag 0 dekanterades lingonjuicen (Lyckeby Culinar AB, bär plockade i Värmland) i en steril bägare varefter 4 ml lingonjuice tillsattes det flytande livsmedlet (n = 24) genom injektion med spruta och kanyl. 26,1 g natriumbensoat och 29,7 g kaliumsorbat löstes i 1 kg sterilt vatten, 4 ml av lösningen tillsattes det flytande livsmedlet (n = 25) med spruta och kanyl. Resterande behölls i sin ursprungliga form (n = 24). Se figur 2.

## Beredning och tillsättning av suspension

Dag 0 tvättades *K. marxianus* respektive *L. plantarum* och OD ställdes till 1.0. En spädningsserie utfördes och den vars koncentration som låg inom intervallet log 2–3 användes sedan till suspensionen. *C. cladosporioides* och *R. stolonifer* skördades till 2x10 ml pepton 0,1% (bilaga 2). *L. plantarum*, *C. cladosporioides*, *R. stolonifer* och *K. marxianus* mixades samman till en suspension i ett 50 ml Falconrör.

I samtliga flaskor (n = 73) injicerades 400 µl suspension innehållandes 100 µl *L. plantarum*, 100 µl *C. cladosporioides*, 100 µl *R. stolonifer* och 100 µl *K. marxianus*. Flaskorna förvarades i rumstemperatur (20 ± 2°C). Se figur 2.

## Provtagningar

### Mikrobiell provtagning

Vid dag 0, 14 och 30 dagar utfördes provtagningar på flaskor med lingonjuice (n = 5), flaskor med tillsats av kaliumsorbat + natriumbensoat (n = 5) och flaskor utan tillsats av konserveringsmedel (n = 5) (figur 2). Fyra spädningrör förbereddes med 9 ml pepton (0,1%). En spädningsserie utfördes genom att 1 ml pipetterades från flaskan innehållandes det flytande livsmedlet och överfördes till det första spädningröret. Lösningen med pepton 0,1% + 1 ml av det flytande livsmedlet blandades genom att pipettera upp och ner i det första spädningröret för att sedan överföra 1 ml till nästa spädningrör. Spädningen upprepades till 10<sup>-4</sup>. Från den flytande produkten och samtliga spädningrör pipetterades 100 µl till en MEA platta och en TGE platta. Metoden för spädningsserien upprepades för samtliga flaskor (n = 15). Plattorna inkuberades i 22,5 ±

0,5°C. Provtagningarna analyserades två och fyra dagar efter inkubering genom att räkna antal CFU på agarplattorna (figur 2).

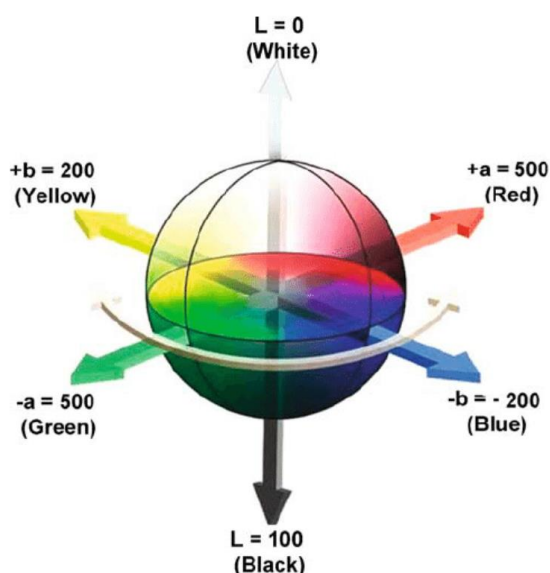
Allt laborativt arbete utfördes med sterilteknik och materialet som användes var autoklaverat.

## Fysikaliska och kemiska mätningar

Vid 0, 14 och 30 dagar utfördes även mätningar för analys av viskositet (Brookfield Viscometer LV DV2T), färg (Konica Minolta Spectrophotometer CM-600d) och pH (pH-meter METTLER TOLEDO EL20). Mätinstrumenten kalibrerades innan mätningarna påbörjades. Samtliga metoder utfördes på livsmedlet med lingonjuice (n = 1), livsmedlet med tillsats av kaliumsorbat + natriumbensoat (n = 1) och livsmedlet utan tillsats av konserveringsmedel (n = 1) och mätningarna replikerades (n = 3). Därefter beräknades ett medelvärde (M) och standardavvikelse (SD) på resultaten.

## Mätning av färg

Det flytande livsmedlet hälldes upp med en volym på 20 ml i en petriskål och dess botten placerades mot färgmätarens öppning. Därefter trycktes mätningsskärmen in och resultatet visades på skärmen angivet i beteckningarna L, a och b. Där L står för ljusheten från svart till vitt, a från grönt till rött och b från blått till gult (nix Color Sensor, u.å).



Figur 3. Visar värdena för L\*, a\* och b\*.

## **Mätning av viskositet**

Mätningarna har genomförts med spindel SC4-25 och en provmängd på 16,1 ml av det flytande livsmedlet. "Run" trycktes in och efter 30 sekunder visades resultatet på skärmen angivet i mPas.

## **Mätning av pH-värde**

Det flytande livsmedlet hölls upp med en volym på 15 ml i en plastkopp och placerades under mätstickan. Efter det sänktes stickan ned i det flytande livsmedel och "start" trycktes in. När pH-mätaren visade ett A med ett tak var mätningen klar.

## **Statistiska metoder**

Beräkning av CFU/ml, medelvärdet (M) av CFU/ml, standardavvikelse (SD) och log<sub>10</sub>-värde utfördes och sammanställdes i ett Exceldokument. Dessa värden användes för att kunna jämföra korrelationen mellan tillväxt av mikroorganismer och tid för de olika konserveringsmedlen. Korrelationsanalysen utfördes med hjälp av Pearsons korrelationskoefficient och därefter beräknades regression i kvadrat för att beskriva hur sambandet mellan tillväxt av mikroorganismer och tid såg ut. Resultatet av detta kunde därefter påvisa eventuell skillnad mellan konserveringsmedlen.

Resultaten av mätningar för färg, pH och viskositet antecknades och användes för att undersöka huruvida några fysikaliska och kemiska förändringar skedde i produkten över tid.

## **Etiska överväganden**

Denna studie är genomförd som uppdragsforskning från Lyckeby Culinar AB. Vetenskapsrådet (2017) beskriver hur uppdragsforskning kännetecknas av att den ska leda till nytta för den som beställt forskningen. Produkten som använts i studien har avidentifierats till att enbart beskrivas som ett flytande livsmedel. Detta har gjorts på grund av den sekretess Lyckeby Culinar AB avlagt gentemot sina kunder.

I studien ingår inga försök på människor eller djur vilket innebär att denna typ av etiska överväganden inte behöver beaktas.

## Resultat

I detta avsnitt presenteras de resultat som erhöles av pilotförsök innefattande test av material till studien, test för *L. plantarum*s förmåga att tillväxa i aerob respektive anaerob miljö, test för tillväxttemperatur och tillväxthastighet för samtliga mikroorganismer samt metod för koncentrationsbestämning. Därefter presenteras resultatet från de mikrobiologiska provtagningarna på det flytande livsmedlet. Sist presenteras resultatet från de fysikaliska mätningarna viskositet samt färg. Likaså resultatet från den kemiska mätningen av pH-värdet.

## Pilotförsök

### Material

Efter pilotförsök där material testades upplevdes inget baksug i spruta (10 ml) och kanyl vid provtagning. För enklare avläsning av 400 µl suspension beslutades att en mindre spruta (2,5 ml) skulle användas till dag 0.

## Temperatur och tillväxthastighet

Tabell 2. Antal tillväxtdagar av de olika mikroorganismerna vid  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

Art	Temperatur $\pm 0,5^\circ\text{C}$	Dagar
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	25	2–3
<i>Lactobacillus plantarum</i>	25	2–3
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	25	4–5
<i>Rhizopus stolonifer</i>	25	4–5

Tabell 2 visar att kolonibildning vid  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$  sker efter 2–3 dagar för *K. marxianus* och *L. plantarum*, samt efter 4–5 dagar för *C. cladosporides* och *R. stolonifer*.

## Aerob eller anaerob miljö

Eftersom *L. plantarum* är fakultativ anaerob (Adams et al., 2016) utfördes en laboration för att fastställa om användning av anaerobklocka var nödvändigt i belastningstestet. Efter analysering genom räkning av CFU visade resultatet att tillväxt i anaerobklocka och



aerob miljö skedde inom samma logaritm. Därav drogs slutsatsen att *L. plantarum* tillväxer lika bra i aerob miljö som i anaerob miljö. I belastningstestet kunde därmed en aerob miljö användas.

### **Metod för koncentrationsbestämning av *C. cladosporides* och *R. stolonifer***

För att kunna tillsätta rätt mängd mikroorganismer (log 2–3/ml) till provet utfördes koncentrationsbestämning av *C. cladosporides* och *R. stolonifer*. Metoderna som provades var OD-mätning och Bürkerkammare. Resultatet visade att Bürkerkammare var den mest lämpliga metoden att använda för koncentrationsbestämning av *C. cladosporides* och *R. stolonifer*. Sporer räknades per ml.

## **Belastningstest**

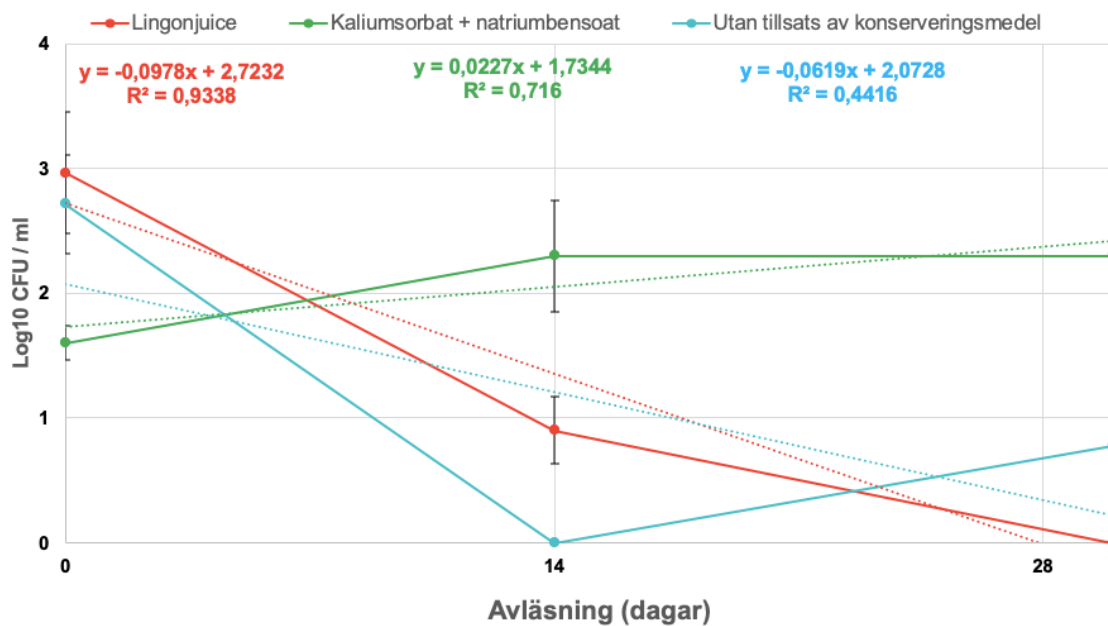
### **Verifiering av suspension**

**Tabell 3.** Visar volym av suspension som tillsattes livsmedlet dag 0. Verifiering av det totala antalet mikroorganismer som tillsattes det flytande livsmedlet presenterat i CFU/180 ml och medelvärde log<sub>10</sub> CFU/ml. Mätningarna utfördes i duplikat.

<b>Provtagningsstillfälle</b>	<b>Volym av suspension tillsatt livsmedlet (µl)</b>	<b>Resultat suspension CFU/180 ml</b>	<b>Log<sub>10</sub> CFU/ml</b>
<b>Dag 0</b>	400	230 000	2–3

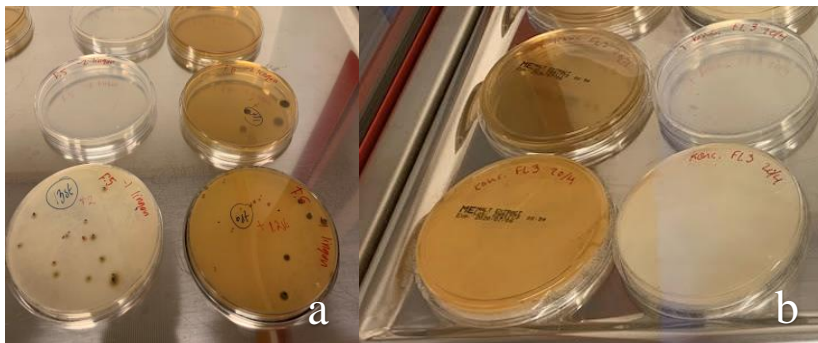
Verifieringen av suspensionen (tabell 3) visar att den mängd suspension (400 µl/flaska) som inokulerats livsmedlet vid dag 0 ligger inom intervallet log 2–3 /ml livsmedel.

## Jämförelse av konserveringsmedel i förhållande till tillväxt



**Figur 4.** Jämför lingonjuice (n = 5), kaliumsorbat + natriumbensoat (n = 5) och livsmedlet utan tillsatt konserveringsmedel (n = 5) i förhållande till tillväxt över tid. CFU/ml i log<sub>10</sub>, trendlinje och felstaplar som representerar mätningarnas standardavvikelser (SD) vid 0, 14 och 30 dagar. Visar även regression ( $R^2$ ).

Mikroorganismerna som identifierades efter provtagning vid dag 0 var *C. cladosporides* och *R. stolonifer*. Vid avläsning dag 14 och dag 30 identifierades endast *R. stolonifer*. *K. marxianus* samt *L. plantarum* identifierades inte vid någon av avläsningarna.



**Figur 5.** Tillväxt av mikroorganismer i livsmedlet efter provtagning vid dag 0. **a & b:** Agarplattor i spädning -1 med tillväxt av *C. cladosporides* (svarta kolonier) och *R. stolonifer* (vitt mycel). Fotograf: Nathalie Johnsson

Vid dag 0 utfördes första provtagningen, vilken enligt figur 4 visar tillväxt av mikroorganismer inom intervallet log 2–3 /ml för livsmedlet med tillsatt lingonjuice samt livsmedlet utan tillsatser. Livsmedlet med tillsats av kaliumsorbat + natriumbensoat visade tillväxt som motsvarar en koncentration mellan log 1–2 /ml.

**Tabell 4.** Mikroorganismernas tillväxt i livsmedlet med tillsats av lingonjuice (n = 5), kaliumsorbat + natriumbensoat (n = 5) och livsmedlet utan tillsatt konserveringsmedel (n = 5) vid 0, 14 och 30 dagar i log<sub>10</sub> CFU/ml samt Pearsons korrelationskoefficient.

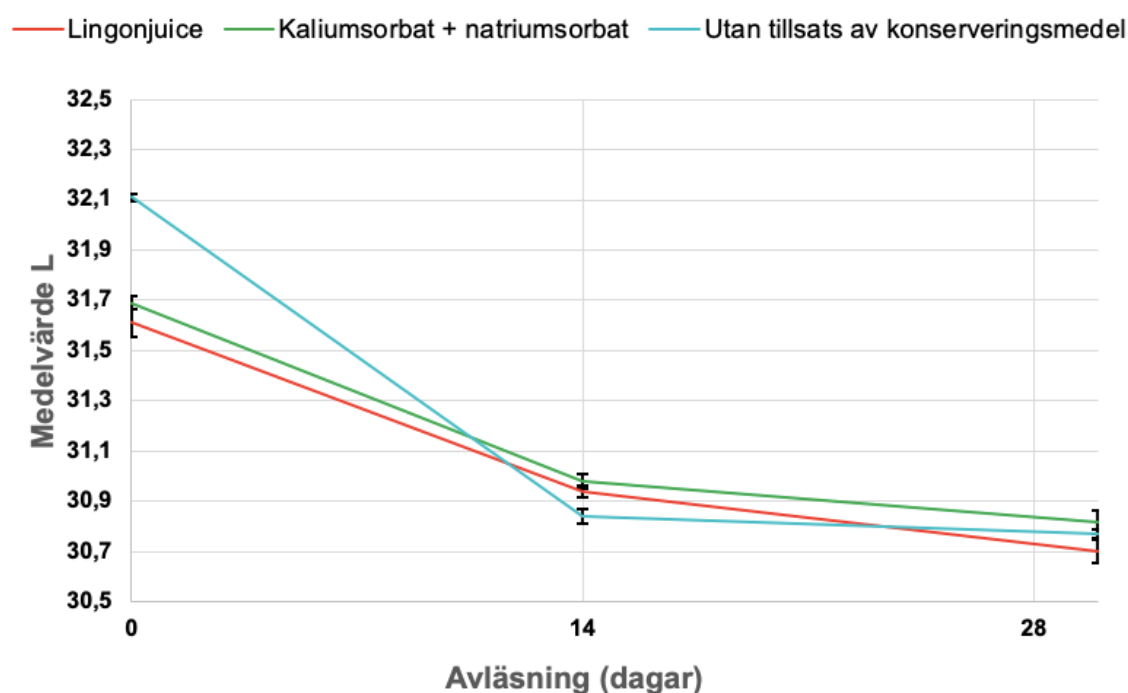
Antal dagar	Livsmedel med tillsatt lingonjuice	Livsmedel med tillsatt kaliumsorbat + natriumbensoat	Livsmedel utan tillsats
<b>0</b>	3,0	1,6	2,7
<b>14</b>	0,9	2,3	0,0
<b>30</b>	0,0	2,3	0,8
<b>Pearsons korrelationskoefficient</b>	<b>-1,0</b>	<b>0,8</b>	<b>-0,7</b>

Tabell 4 visar mikroorganismernas tillväxt i livsmedel över tid, med provtagningar vid 0, 14 och 30 dagar. För livsmedlet med tillsatt lingonjuice ligger Pearsons korrelationskoefficient på -1,0 och visar ett starkt negativt samband mellan tillväxt av mikroorganismer och tid. För livsmedlet med tillsatt kaliumsorbat + natriumbensoat visar tabell 4 värdet för korrelationskoefficient på 0,8 vilket indikerar på ett starkt positivt samband mellan tillväxt av mikroorganismer och tid. För livsmedlet utan tillsats av konserveringsmedel ligger värdet för Pearsons korrelationskoefficient på -0,7 vilket indikerar ett starkt negativt samband mellan tillväxt av mikroorganismer och tid.

Figur 4 visar även resultatet av regressionsanalysen. Värdet för livsmedlet med lingonjuice är närmst 1 då  $R^2 = 0,9338$ , vilket indikerar på kortast tid för minskning av antal celler. Livsmedlet med tillsatt kaliumsorbat + natriumbensoat samt det utan tillsats av konserveringsmedel visar ett lägre värde av  $R^2$ , vilket indikerar på längre tid för minskning av antal celler.

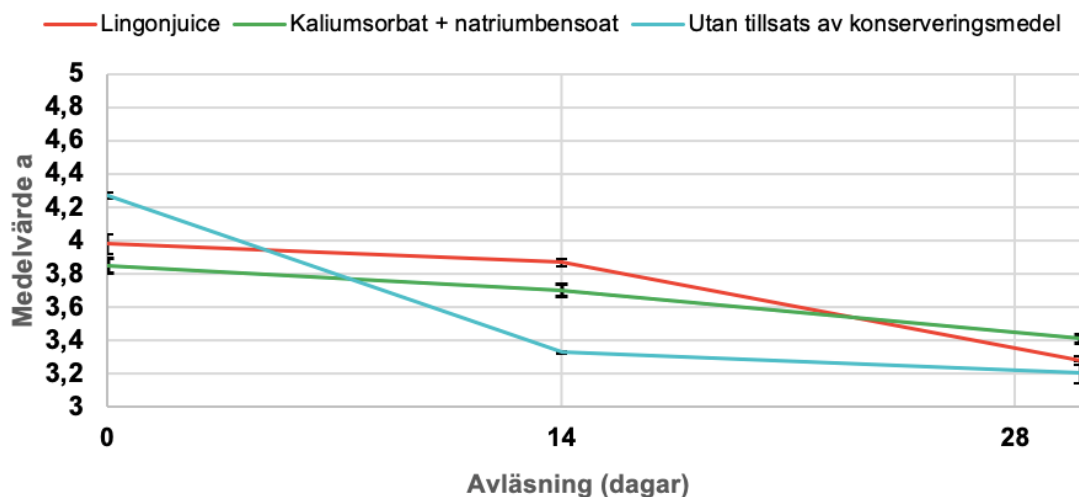
## Fysikaliska och kemiska förändringar

### Mätning av färg



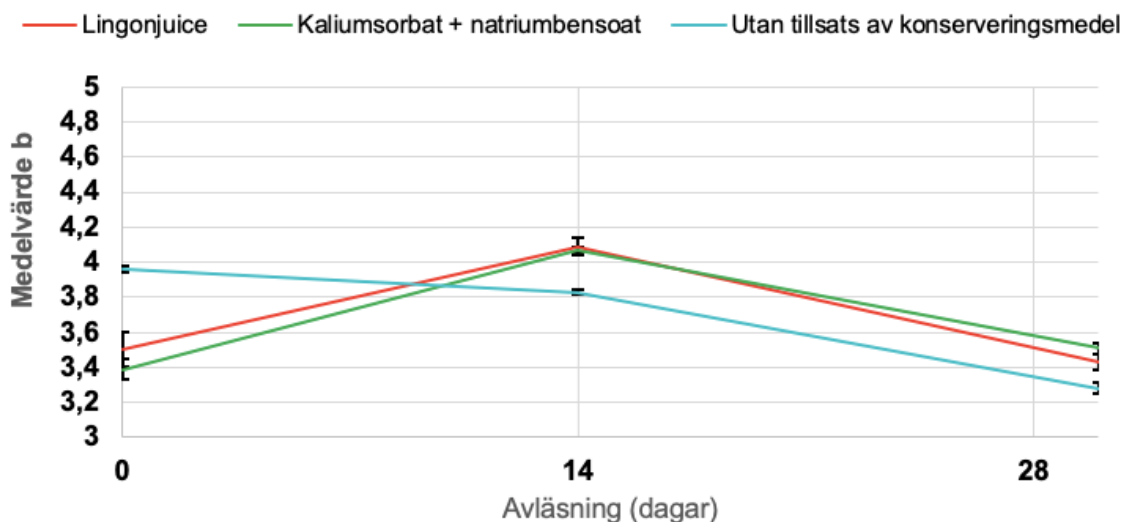
**Figur 6.** Förändring av L över tid. Resultatet presenterar medelvärde (M) efter mätningar av L vid 0, 14 och 30 dagar. Felstaplarna representerar mätningarnas standardavvikelser (SD). Jämför lingonjuice (n = 3), kaliumsorbat + natriumbensoat (n = 3) och livsmedlet utan tillsatt konserveringsmedel (n = 3).

I figur 6 framgår det att värdet för L dag 0 skiljer sig åt mellan samtliga varianter av det flytande livsmedlet. Livsmedlet med lingonjuice och kaliumsorbat + natriumbensoat skiljer sig åt med en marginal på 0,8 enheter. Livsmedlet utan tillsatt konserveringsmedel är något mörkare dag 0. Vid avläsning 14 dagar har värdet för livsmedlet utan tillsatt konserveringsmedel sjunkit och blivit ljusare. Livsmedlet med lingonjuice och kaliumsorbat + natriumbensoat är något mörkare och skiljer sinsemellan med en marginal på 0,4 enheter. Vid avläsning 30 dagar har värdet för samtliga sammanstrålat mellan 30,70–30,82 enheter.



**Figur 7.** Förändring av a över tid. Resultatet presenterar medelvärde (M) efter mätningar av a vid 0, 14 och 30 dagar. Felstaplarna representerar mätningarnas standardavvikelser (SD). Jämför lingonjuice (n = 3), kaliumsorbat + natriumbensoat (n = 3) och livsmedlet utan tillsatt konserveringsmedel (n = 3).

I figur 7 framgår det att värdet av a är högst för livsmedlet utan tillsatt konserveringsmedel vid dag 0. Lingonjuice och kaliumsorbat + natriumbensoat skiljer sig åt med en marginal på 0,13 enheter. Vid avläsning efter 14 dagar har livsmedlet utan tillsatt konserveringsmedel ett lägre värde av a vilket resulterat i marginellt grönare toner. Minst förändring skedde i livsmedlet med tillsatt lingonjuice. Vid avläsning efter 30 dagar har värdet för samtliga sammanstrålat mellan 3,21–3,41 enheter.



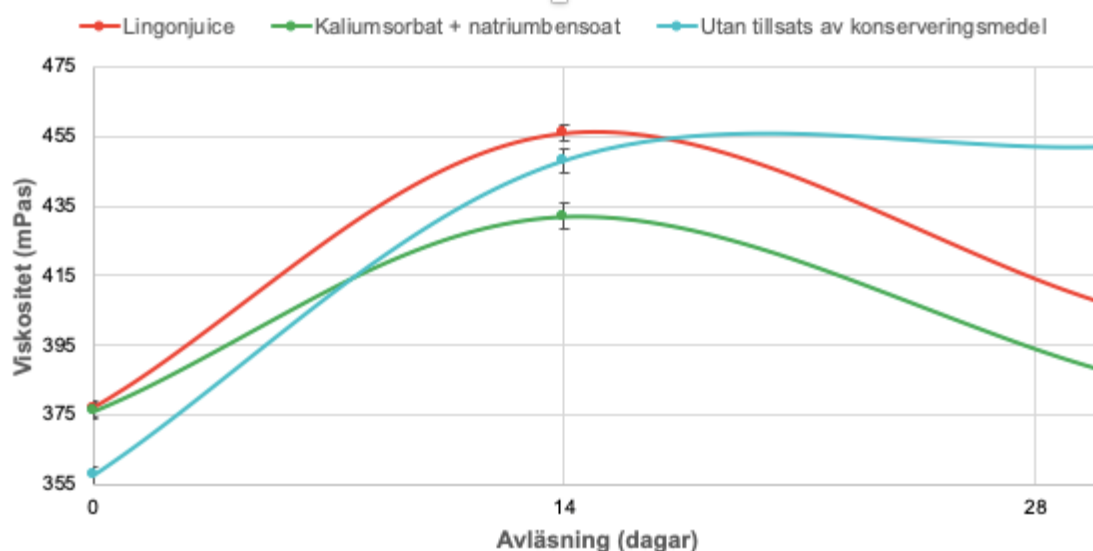
**Figur 8.** Förändring av b över tid. Resultatet presenterar medelvärde (M) efter mätningar av b vid 0, 14 och 30 dagar. Felstaplarna representerar mätningarnas standardavvikelser (SD). Jämför lingonjuice (n = 3), kaliumsorbat + natriumbensoat (n = 3) och livsmedlet utan tillsatt konserveringsmedel (n = 3).

I figur 8 framgår det att värdet av b är högst för livsmedlet utan tillsatt konserveringsmedel vid dag 0. Livsmedlet med lingonjuice och kaliumsorbit + natriumbensoat skiljer sig åt med en marginal på 0,11 enheter och är något blåare än livsmedlet utan något tillsatt konserveringsmedel. Vid avläsning 14 dagar har livsmedlet utan tillsatt konserveringsmedel gått mer åt blåa toner och lingonjuice samt kaliumsorbit + natriumbensoat har istället blivit något gulare. Vid avläsning efter 30 dagar har värdet för samtliga sammanstrålat mellan 3,28–3,51 enheter.

### Mätning av viskositet

**Tabell 5.** Förändring av viskositet (mPas) över tid. Resultatet presenterar medelvärde (M) och standardavvikelse (SD) efter mätningar av viskositet vid 0, 14 och 30 dagar. Jämför lingonjuice (n = 3), kaliumsorbit + natriumbensoat (n = 3) och livsmedlet utan tillsatt konserveringsmedel (n = 3).

Antal dagar	Livsmedel med tillsatt lingonjuice	Livsmedel med tillsatt kaliumsorbit + natriumbensoat	Livsmedel utan tillsatt
	(M ± SD)	(M ± SD)	(M ± SD)
<b>0</b>	376,8 ± 2,4	376 ± 1,4	357,6 ± 2,4
<b>14</b>	456 ± 2,4	432 ± 4,2	448 ± 3,7
<b>30</b>	407,2 ± 1,4	386,4 ± 1,4	452 ± 1,4



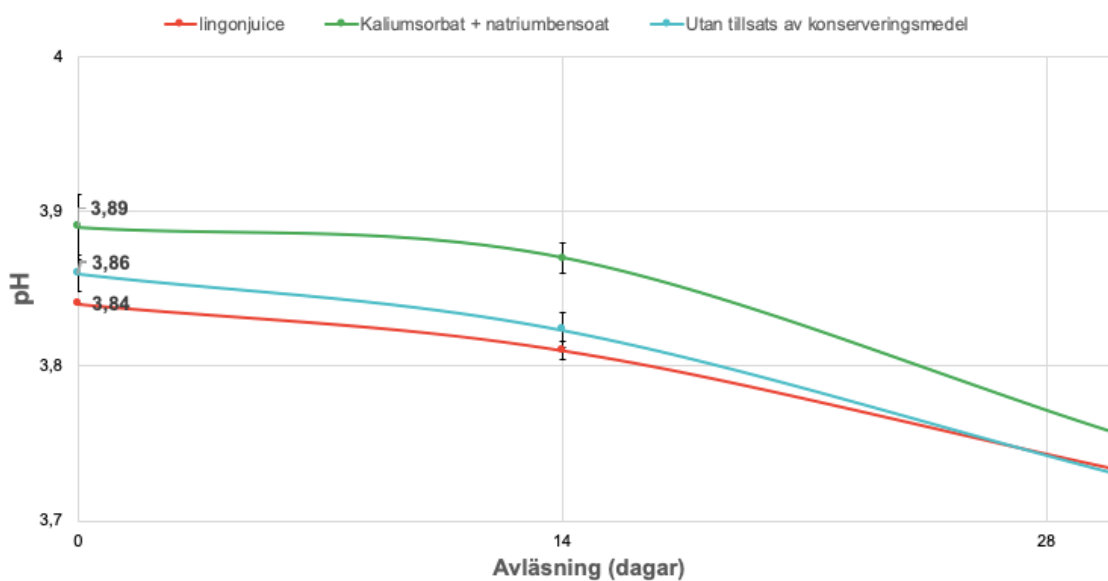
**Figur 9.** Förändring av viskositet (mPas) över tid. Resultatet presenterar medelvärde (M) efter mätningar av viskositet vid 0, 14 och 30 dagar. Felstaplarna representerar mätningarnas standardavvikelse (SD). Jämför lingonjuice (n = 3), kaliumsorbit + natriumbensoat (n = 3) och livsmedlet utan tillsatt konserveringsmedel (n = 3).

Vilket framgår i tabell 5 och figur 9 följer livsmedlet med tillsats av lingonjuice och kaliumsorbat + natriumbensoat liknande mönster i sin förändring vid de olika mättillfällena. Dag 0 är viskositeten i de båda varianterna åtskilda med en marginal på 0,8. Däremot har livsmedlet med kaliumsorbat + natriumbensoat en lägre viskositet efter 14 dagar än livsmedlet med lingonjuice. Dag 0 är viskositeten i livsmedlet utan tillsats av konserveringsmedel lägst. Dess kurva ökar likt livsmedlet med lingonjuice men skiljer sig åt vid avläsning 30 dagar då viskositeten i livsmedlet utan tillsats av konserveringsmedel har en mer utplanande kurva än vad de båda andra har.

## Mätning av pH-värde

**Tabell 6.** Förändring av pH-värde över tid. Resultatet presenterar medelvärde (M) och standardavvikelse (SD) efter mätningar av pH vid 0, 14 och 30 dagar. Jämför lingonjuice (n = 3), kaliumsorbat + natriumbensoat (n = 3) och livsmedlet utan tillsatt konserveringsmedel (n = 3).

Antal dagar	Livsmedel med tillsatt lingonjuice	Livsmedel med tillsatt kaliumsorbat + natriumbensoat	Livsmedel utan tillsats
	(M ± SD)	(M ± SD)	(M ± SD)
0	3,84 ± 0,00	3,89 ± 0,02	3,86 ± 0,01
14	3,81 ± 0,01	3,87 ± 0,01	3,82 ± 0,01
30	3,73 ± 0,01	3,76 ± 0,01	3,73 ± 0,00



**Figur 10.** Förändring av pH över tid. Resultatet presenterar medelvärde (M) efter mätningar av pH vid 0, 14 och 30 dagar. Felstaplarna representerar mätningarnas standardavvikelse (SD). Jämför lingonjuice (n = 3), kaliumsorbat + natriumbensoat (n = 3) och livsmedlet utan tillsatt konserveringsmedel (n = 3).

Resultaten i tabell 6 och figur 10 visar att samtliga produkter vid dag 0 hade ett högre pH värde än ursprungsprodukten. Utan tillsatser av konserveringsmedel eller suspension ligger livsmedlets ursprungliga pH på 3,82. Ökningen av pH i livsmedlet med tillsatt lingonjuice förändrades till 3,84 efter tillsättning av lingonjuice, livsmedlet med tillsatt kaliumsorbat + natriumbensoat förändrades till 3,89 och för livsmedlet utan tillsatt konserveringsmedel förändrades pH-värdet till 3,86. Tabell 6 och figur 10 visar en mindre sänkning av pH i samtliga livsmedel vid varje provtagningstillfälle.

## Diskussion

### Resultatdiskussion

#### Jämförelse av konserveringsmedel i förhållande till tillväxt

Sambandet mellan tillväxt av mikroorganismer och tid för livsmedlet med tillsatt lingonjuice är starkt negativt vilket indikerar på ett starkt samband mellan mikroorganismernas tillväxt i livsmedlet över tid (tabell 4). Detta kan anses vara positivt utifrån huruvida naturlig bensoesyra, tillsatt livsmedlet i form av lingonjuice, står sig i förhållande till syntetisk framställt konserveringsmedel. Att naturligt framställt konserveringsmedel visar bättre resultat än syntetiskt framställt konserveringsmedel är även positivt utifrån konsumenttrenden “ren etikett” (Saltmarsh, 2015).

Resultaten för verifiering av suspension (tabell 3) indikerar att mikroorganismer tillsattes mellan log 2–3/ml livsmedel, vilket följer rekommendationerna angående den inokulationsnivå Microbiological challenge testing (2003) hänvisade till. Microbiological challenge testing (2003) beskriver vidare att produkter som testas i ett belastningstest för validering av livsmedlets stabilitet bör klara av att avdöda den mängd mikroorganismer som är förutbestämt, det vill säga log 2–3/ml. Ytterligare studier och fler provtagningar krävs för verifiering och för att kunna dra slutsatsen att det flytande livsmedlets hurdles är tillräckliga för den avdödning som krävs.

Det flytande livsmedlet med tillsatt kaliumsorbat + natriumbensoat motsvarar vid första provtagningstillfället inte log 2–3/ml som tillsattes vid dag 0, utan uppnådde enbart en koncentration på log 1–2/ml (tabell 4 och figur 4). Vid senare provtagning (dag 14) visade resultatet en ökning av mikroorganismernas tillväxt i livsmedlet (figur 4). Tillväxten av mikroorganismer i livsmedlet med tillsatt kaliumsorbat + natriumbensoat tyder på att mikroorganismerna inte hämmas av konserveringsmedlet. Spanu et al. (2014) nämner en “holding period” för att mikroorganismerna som tillsatt livsmedlet ska hinna anpassa sig



till dess befintliga miljö. Att mikroorganismerna tillväxer mer efter 14 dagar kan därför bero på deras tid att anpassas till den nya miljön.

Med tanke på att  $R^2$  är 0,4416 för livsmedlet utan tillsats av konserveringsmedel anses sambandet mellan mikroorganismernas tillväxt och tid vara svagt (44,16%) och enbart en eventuell slutsats kring ”holding period” kan dras. Detta eftersom resultatet indikerar på en hämning efter 14 dagar och sedan tillväxt igen efter 30 dagar. För att undersöka om det finns ett starkare samband mellan mikroorganismernas tillväxt och tid hade fler mätningar behövts utföras.

Ett resonemang kring varför livsmedlet med tillsatt kaliumsorbat + natriumbensoat har lägre koncentration av mikroorganismer ( $\log 1-2/\text{ml}$ ) i förhållande till de andra varianterna ( $\log 2-3/\text{ml}$ ) vid provtagning på dag 0, kan bero på en upplevd svårighet att blanda produkten på grund av begränsat utrymme mellan yta och oblat efter tillsättning. Begränsningen av blandningen kan ha medfört att de mikroorganismer som inokulerades inte blev jämnt fördelade i livsmedlet.

*K. marxianus* och *L. plantarum* identifierades inte vid någon av avläsningarna, detta kan antas bero på att ursprungsproduktens låga pH-värde (3,82) hämmat dess tillväxt. Vanligtvis tillväxer *K. marxianus* i pH 5 (Fonseca et al., 2008) och *L. plantarum* tillväxer i pH 3,9–5,6 (Machielsen et al., 2010). Fler undersökningar hade behövts utföras för att identifiera anledning till *K. marxianus* och *L. plantarum*s frånvaro vid analys.

En slutsats som kan dras är att det mest effektiva konserveringsmedlet för livsmedel med lågt pH-värde är lingonjuice (figur 4). I samband med regressionsanalysen kan likaså en slutsats dras att lingonjuice är det konserveringsmedel som kräver kortast tid för att minska antalet celler alternativt hämma mikroorganismernas tillväxt (figur 4).

## **Mätning av fysikaliska och kemiska egenskaper**

### **Mätning av färg**

Enligt figur 3 indikerar ett högt L-värde på mörka toner. Att livsmedlet utan tillsats av konserveringsmedel har det högsta värdet av L vid avläsning 0 dagar (figur 6) är väntat då denna produkt inte späts ut. Livsmedlet med tillsatt lingonjuice och livsmedlet med tillsatt kaliumsorbat + natriumbensoat har ett marginellt lägre L-värde än livsmedlet utan tillsättning av konserveringsmedel (figur 6), vilket inte indikerar på en signifikant skillnad.

Efter vardera avläsningen får samtliga produkter ett marginellt lägre L-värde vilket eventuellt beror på mätfel som innefattade att mängden prov som togs ut vid varje provtagningstillfälle inte var konsekvent. Anledningen till att provmängden inte blev konsekvent berodde på svårigheter att suga upp provet ur flaskan och överföra till en petriskål med hjälp av en engångspipett (3 ml). De prov som innehöll en mindre volym kan därmed gett upphov till ett lägre L-värde. Trots marginella förändringar av L-värdet för livsmedlet med tillsatt lingonjuice och livsmedlet utan tillsättning av konserveringsmedel följer förändringarna liknande mönster i både figur 4 och figur 6. Detta kan antas bero på att L-värdet sjunker i takt med mikroorganismernas hämning. För att kunna hitta tydligare orsaker behövs fler mätningar utföras.

Gällande värdet för a förväntades livsmedlet med lingonjuice indikera på röda toner då lingon har en röd färg. Ett jämförande mellan figur 3 och värdet för a i figur 7 vid dag 0 tyder på att färgen i samtliga prov går åt det röda hållet, om än marginellt. Ett högre a-värde ger en rödare färg (figur 3). Livsmedlet utan konserveringsmedel har ett marginellt högre a-värde än livsmedlet med tillsatt lingonjuice, vilket indirekt pekar mot att lingonens röda färg inte påverkar livsmedlets färg efter tillsättning.

Då lingonen som tillsattes (4 ml) endast utgjorde 2,2% av livsmedlet kan en tolkning vara att detta är en för liten mängd för att synas vid mätning av färg. Det krävs ytterligare mätningar för att identifiera om lingonens röda färg kan gett upphov till en röd ton i livsmedlet med tillsatt lingonjuice. Inget blanktest av färg utfördes på lingonjuice innan tillsättning. Att samtliga produkter antydde på liknande värden av a behöver undersökas vidare för att dra rimliga paralleller till orsak. Inget samband mellan värdet för a och tillväxt av mikroorganismer i livsmedlet kunde identifieras.

Resultaten av b-värdet är inkonsekventa och inga tydliga paralleller kan dras till huruvida b-värdet påverkas av mikroorganismernas tillväxt eller hämning. Om de marginella förändringarna beror på mätfel, påverkan av mikroorganismer eller konserveringsmedel krävs ytterligare undersökningar för att säkerställa. När mikroorganismerna hämmas vid 14 dagar i livsmedlet med tillsatt lingonjuice (figur 4) tycks värdet för b öka marginellt (figur 8). I livsmedlet med tillsatt kaliumsorbat + natriumbensoat sker marginella förändringar av b-värdet i takt med att mikroorganismerna ökar i koncentration. För livsmedlet utan tillsättning av konserveringsmedel blir b-värdet marginellt lägre när mikroorganismerna hämmas.

De gemensamma slutsatser som kan dras kring mätningarna av L, a och b är att livsmedlet utan tillsats av konserveringsmedel tycks haft ett marginellt högre värde vid dag 0, att livsmedlet med lingonjuice och kaliumsorbat + natriumbensoat tenderat att följa samma kurva och att värdena för samtliga livsmedel sammanstrålat vid dag 30. De diagram som presenteras visar inga signifikanta skillnader gällande färg över tid och detta är inte heller något som är visuellt tydligt. För att kunna svara på vad som är den bidragande orsaken krävs ytterligare studier.

## **Mätning av viskositet**

Det faktum att livsmedlet utan tillsats av konserveringsmedel startar vid en lägre viskositet (figur 9) är förvånande eftersom den inte fått tillsättning i form av konserveringsmedel och därmed inte späts ut. Vad gäller livsmedlet med lingonjuice och livsmedlet med kaliumsorbat + natriumbensoat sjunker viskositeten efter avläsning 14 dagar. Vid avläsning efter 30 dagar utmärker sig livsmedlet utan tillsats av konserveringsmedel och vad detta resultat beror på är oklart. Inga tydliga paralleller kan dras till diagram och tabeller över pH, färgmätningar eller mikroorganismernas tillväxt.

Figur 4 visar hämning av mikroorganismer vid dag 14 medan viskositeten (mPas) i figur 9 ökar. Vid avläsning dag 30 visar figur 4 ökad tillväxt i samtliga livsmedel förutom livsmedlet med tillsatt lingonjuice och i figur 9 sjunker viskositeten igen efter 30 dagar. Det kan därmed antas finnas ett samband mellan mikroorganismernas tillväxt och sänkning i viskositet. Fler mätningar av viskositet hade behövts göras för att identifiera ett tydligare samband mellan viskositet och mikroorganismernas tillväxt över tid. Eftersom det inte gick att urskilja samband mellan pH-värdets sänkning och viskositet hade även detta kunnat forskas vidare på. Mer kunskap kring de inokulerade mikroorganismerna hade behövts för att få en djupare förståelse för dess tillväxt i olika miljöer.

Då problem upplevdes vid pipettering av produkten kan därav risken för icke konsekvent uppmätning av provmängden vara möjlig anledning till missvisande resultat. Trots detta kan en slutsats dras att det sker en marginell förändring av viskositet i produkten över tid efter tillsats av konserveringsmedel och mikroorganismer.

## Mätning av pH-värde

I resultatet som framgår av tabell 6 kan det urskiljas svag ökning av pH i samtliga prov vid dag 0. Höjningen kan antas bero på tillsättningen av mikroorganismer ( $\log 2-3/\text{ml}$ ) samt konserveringsmedel (4 ml) innan provtagning då livsmedlet blivit utspädd. Spanu et al. (2014) underströk vikten av att tillsättningen mikroorganismer till livsmedlet som testas i ett belastningstest inte bör överskrida 1% av innehållet. Vilket beror på att produkten ska vara så lik ursprungsprodukten som möjligt, och att tillsatsen mikroorganismer ska efterlikna en naturlig kontamination. Livsmedlet som undersökts i detta test har en volym på 180 ml vilket medför en tillsättning av max 1,8 ml mikroorganismer. Till det flytande livsmedlet med lingonjuice och livsmedlet med tillsatt kaliumsorbat + natriumbensoat tillsattes 400  $\mu\text{l}$  cellsuspension, samt 4 ml konserveringsmedel, vilket innebär att den totala tillsättningen i dessa livsmedel ligger på 4,4 ml. Detta medför en total förändring på 2,4% av det flytande livsmedlets innehåll. I livsmedlet utan tillsatt konserveringsmedel tillsattes endast 400  $\mu\text{l}$  cellsuspension och innebär en förändring på 0,22%. En slutsats som kan dras i detta belastningstest är att den totala volym som tillsats livsmedlet har förändrat innehållet med 2,2%, vilket är 1,2% mer än vad Spanu et al. (2014) rekommenderar.

En likvärdig ökning förväntades i livsmedlet med tillsatt lingonjuice och i livsmedlet med tillsatt kaliumsorbat + natriumbensoat. Samt en mindre ökning i livsmedlet utan tillsatt konserveringsmedel eftersom en mindre mängd vätska totalt tillsattes. Efter tillsättning av lingonjuice visade pH-förändringen inte på någon signifikant skillnad vilket kan bero på lingonjuicens naturliga syra. För att verifiera detta hade en pH-mätning på lingonjuice behövts göras innan tillsättning.

Att pH-värdet har en jämn sänkning i samtliga produkter kan däremot antas bero på *L. plantarum*s förmåga att producera mjölksyra (Adams et al., 2016). För att ta reda på vad pH-värdets minskning beror på behövs fler provtagningar för artidentifiering utföras samt undersöka *L. plantarum*s förmåga att producera mjölksyra i en redan sur miljö.

## Bortfallsanalys

Under studien gjordes iakttagelser att den tid och temperatur som nyttjades för agarplattorna i inkubatorn hade behövts förändrats. Brytpunkten för avläsning skedde efter fyra dygn i  $22,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Efter pilotförsöket för undersökning av inkubationstid och temperatur (tabell 2) bestämdes att fyra dygn var den tid som skulle nyttjas i

belastningstestet. Då kolonierna för *R. stolonifer* uppkom snabbare (Bullerman, 2003) än de övriga mikroorganismerna bestämdes att en lägre temp än 25°C skulle nyttjas under belastningstestet. Detta för att inte missa någon avläsning av kolonier. Ett problem som istället uppstod var att tiden för brytpunkten tycktes vara för kort då fler kolonier upptäcktes i ett senare skede. Detta faktum är något som bör tas i beaktning vid tolkning av resultatet för avläsningarna av CFU.

## **Metoddiskussion**

### **Pilotförsök**

Något som upptäcktes på dag 0 var att oblatet på flaskorna som erhöles av Lyckeby Culinar AB var i annat material, vilket medförde att membranet inte fäste lika bra som vid pilotförsöket. Vid första punktering av oblatet upplevdes ett baksug i sprutan vilket orsakade att en liten mängd flytande livsmedel trängde upp mellan oblatet och membranet. Membranet fick inte lika bra fäste, och lossnade därav på (n = 3) flaskor. De flaskor där membranet lossnade togs ur försöket.

Vid pilottestet av material till dagen för inokulering testades en annan typ av flaska samt en annan typ av spruta än det material som användes på dag 0. Sprutan som senare användes till dag 0 rymde en mindre volym; 2,5 ml. Detta innebar att mängden cellsuspension som sögs upp lättare kunde kontrolleras då sprutan hade markeringar för varje 100 µl. Sprutan som användes till injicering av konserveringsmedel och lingonjuice kunde hålla upp till 5 ml vätska och hade inte heller, likt sprutan på 2,5 ml, testats i ett pilotförsök.

Vid provtagningar för analys har 100 µl pipetterats från det flytande livsmedlet direkt till agarplattor. Detta testades aldrig vid pilotförsöket, utan är ett problem som upptäckts under tiden för studien. Materialet som funnits till förfogande har inte tillåtit den mängd prov för den viskositet det flytande livsmedlet har. Denna utmaning har potentiellt medfört olikheter i den mängd vätska som slutligen spridits på agarplattan.

### **Studiedesign**

Svårigheter som upptäcktes under studiens gång innefattade koncentrationsbestämning, referensmaterialet och duration av provtagning. Sist tas även det förenklande momentet i studien upp kring beredning och tillsättning av suspension.

OD-mätning är inte en vanligt förekommande metod för koncentrationsbestämning av mögelsvampar, så som för jäst och bakterier. Detta beror på att mögelsvamparna växer i hyfala filament och inte som enskilda celler (Sardella, Gatt & Valdramidis, 2018). När *L. plantarum* och *K. marxianus* koncentrationsbestämdes uppkom inga problem då de är en bakterie respektive jästsvamp (Thougaard et al. 2012) vilka inte skapar filament. När OD-mätningen utfördes på *R. stolonifer* och *C. cladosporides* var resultaten oregelbundna och svåra att tyda vilket berodde på deras hyfala filament. På grund av detta utfördes istället beräkning av celler i Bürkerkammare då detta gav ett regelbundet resultat och därmed tycks vara en metod som tillåter mögelsvamparnas hyfala filament.

Tre av de fyra arter mikroorganismer som tillsattes livsmedlet hittades i ett referensmaterial som fanns tillgängligt av uppdragsgivaren och bestod av *K. marxianus*, *R. stolonifer* och *C. cladosporides* (Livsmedelsverket, RM Food 2019:7). Referensmaterialet kan enligt Livsmedelsverket (2019d) användas för kvantitativ kontroll av mikrobiologiska analyser. FDA (2000) beskriver att surrogatmikroorganismer kan användas vid ett belastningstest där mikroorganismernas virulens inte är önskad. I testet tillsattes *L. plantarum* som en surrogat då en del mjölksyrabakterier har egenskapen att förskämma livsmedel (Thougaard et al. 2012). *L. plantarum* är således enkel att isolera och användes därför i detta test. Referensmaterialet som tillhandahölls direkt från uppdragsgivaren innehöll inte specifika förskämningsorganismer för det livsmedlet som testades och riskerar inte heller att kontaminera vid produktion. Dessa faktum bör tas i beaktning i relation till produktutveckling av det flytande livsmedlet eftersom resultatet inte kan generaliseras till den fortsatta produktionen.

De analystillfällen som gjorts i examensarbetet har innefattat analys vid 0, 14 samt 30 dagar. Intervallen mellan analyserna har varit jämna vilket Spanu et al. (2014) rekommenderar. Däremot har provtagningarna inte omfattat 1,5 gånger produktens hållbarhetstid vilket Spanu et al. (2014) likaså rekommenderar. Enligt Microbiological challenge testing (2003) bör mellan fem och sju analystillfällen utföras under belastningstestet, men på grund av tidsramarna för denna studie fanns ingen möjlighet att utföra fler än tre analyser. Provtagningarna inför analyserna utfördes i fem replikat för att stärka resultatets tillförlitlighet, vilket är i god marginal i förhållande till det Spanu et al. (2014) beskrev angående antal.

I denna studie fanns en målsättning att belastningstestet skulle planeras på så sätt att det skulle kunna genomföras med så få kritiska moment som möjligt. Detta för att undvika

potentiella risker som i sin tur kunde påverka resultatet. Ett av dessa kritiska moment syftade till inokuleringen av suspensionen. Både Spanu et al. (2014) och Microbiological challenge testing (2003) beskrev att mikroorganismerna kunde beredas till en gemensam suspension som blandades precis innan inokulering. Faktumet att flera stick i membranet och oblatet kunde undvikas möjliggjorde att detta kritiska moment förenklades i studien.

## **Tillsättning av cellsuspension, lingonjuice och kaliumsorbat + natriumbensoat**

Mängden cellsuspension tillsattes lika till samtliga flaskor (n = 73), men volymen av ursprungsprodukten förändrades i livsmedlet med lingonjuice och tillsats av kaliumsorbat + natriumbensoat till 184 ml. Detta medförde en förändring på 2,2% av det flytande livsmedlets innehåll vilket är mer än den 1% som Spanu (2014) förespråkar. För att livsmedlen skulle få lika förutsättningar borde annan form av tillsättning skett till livsmedlet utan tillsats av konserveringsmedel, där endast cellsuspension tillsattes. Vad denna tillsats skulle bestått av hade behövts undersökas så att denna inte medfört att produkten förändrats med avseende på andra faktorer så som pH, vattenaktivitet och salthalt. En annan möjlig utväg vore om det flytande livsmedlet utan tillsats av konserveringsmedel haft en ursprunglig volym på 184 ml exklusive mikroorganismer. Detta för att volymen i det flytande livsmedlet med lingonjuice, kaliumsorbat + natriumbensoat samt det utan någon tillsats skulle haft samma volym efter samtliga tillsatser. Det faktum att livsmedlet utan tillsats av konserveringsmedel inte innehöll mer än 180 ml har eventuellt medfört att denna är för olik de andra livsmedlen.

## **Svårigheter avläsningar**

Den metod som använts för analys av samtliga mikroorganismer har utgått ifrån platträkningsmetoden vilken beskrivs av Adams et al. (2016). Likt det Adams et al. (2016) beskriver kring svårigheter med att räkna mögeltillväxt med hjälp av platträkningsmetoden uppstod problem gällande detta även i denna studie. *R. stolonifer* hade en så pass kort inkubationstid (Bullerman, 2003) att mycelet överväxt plattorna ett flertal gånger. På grund av den korta inkubationstiden för *R. stolonifer* uppstod problem med avläsningar för *L. plantarum* och *K. marxianus* vars kolonier blev svårare att detektera. Metoden kräver anpassning för att minska risken för försvårad avläsning på grund av mögel. Microbiological challenge testing (2003) angav att

surrogatmikroorganismer bland annat kunde väljas ut efter kriteriet att mikroorganismen var lättare att urskilja än den tänkta patogenen, vilket *R. stolonifer* inte levde upp till. Adams et al. (2016) beskriver vikten av att jämföra olika tillväxtmedium för att försäkra sig om att det inte enbart är en mikroorganism som gynnas och därmed skapar en ogynnsam miljö för en annan mikroorganism. Pilotförsök samt efterforskning kring ett mer passande tillväxtmedium hade behövts genomföras innan belastningstestet påbörjats.



**Figur 11.** Överväxt agarplatta med *R. stolonifer*. Fotograf: Elna Crona

## Relevans för huvudområdet mat- och måltidsvetenskap

Microbiological challenge testing (2003) beskriver att ett belastningstest syftar till att kontrollera hur en produkt påverkas av mikroorganismer utifrån dess hurdle gränser. Om sådana test inte utförs finns det en risk att flertalet livsmedel blir förskämda i onödan (Snyder & Worobo, 2018). Med tanke på att vi idag lever i ett miljömedvetet samhälle vore det motsägelsefullt att inte ta tillvara på de tillfällen som finns för att kunna producera så hållbara och säkra livsmedel som möjligt. Enligt UNDP (2020) är matsvinn en återkommande fråga och ett globalt problem. Att livsmedelsindustrin kontinuerligt utför exempelvis belastningstest möjliggör ett bäst före-datum som överensstämmer med verkligheten, vilket minskar risken för förskämning (Snyder & Worobo, 2018).

Att kunna använda ett naturligt framställt konserveringsmedel likt lingonjuice, vilket i denna studie visat sig vara effektivt mot oönskade mikroorganismer, kopplar an till konsumenters efterfrågan kring livsmedel med "ren etikett" (Saltmarsh, 2015). I relation till detta vore det intressant att undersöka vilken effektivitet lingonjuice har gentemot



andra mikroorganismer i förutsättningar som skiljer sig från livsmedlet som använts i denna studie. I framtida studier vore det likaså relevant att undersöka metoder för att bredda kunskapen kring E-nummer.

## **Slutsats**

Resultatet av belastningstestet visade att tillsats av lingonjuice är det konserveringsmedel som har bäst effekt med avseende på produktstabilitet. Samtliga livsmedel med och utan tillsats av konserveringsmedel har förändrats med avseende på pH och viskositet. Gällande färg var skillnaderna minimala och fler studier hade behövts utföras för att dra slutsatser kring mikroorganismernas inverkan på färgförändringar.

Vialen som erhöles innehöll inte de mikroorganismer som vanligtvis återfinns i den typ produkt som undersökts och riskerar inte heller att kontaminera vid produktion. Därför kan enbart en slutsats dras i relation till studien som beskrivits och inte generaliseras till den fortsatta produktionen av produkten.

I denna studie kan de resultat som presenteras innebära ett behov av produktutveckling för att kunna erbjuda en produkt med bäst möjlig produktstabilitet. Huruvida naturliga konserveringsmedel kan användas vid sådan produktutveckling kräver dock vidare studier.

## Referenser

- Adams, M. R., Moss, M. O., & McClure, P. J. (2016). *Food microbiology* (4th ed.). Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Beck-Friis, J., Bruce, Å., Cederholm, T., Danielsson-Tham, M-L., & Lundström, K. (2013). Matens kvaliteter. Kungl. skogs- och lantbruksakademiens tidskrift, 152(4). <https://www.ksla.se/wp-content/uploads/2013/05/KSLAT-4-2013-Matens-kvaliteter.pdf>
- Briceño, E. X., & Latorre, B. A. (2008). Characterization of *Cladosporium* rot in grapevines, a problem of growing importance in Chile. *Plant disease*, 92(12), 1635–1642. doi: 10.1094/PDIS-92-12-1635
- Bullerman, L.B (2003) *Spoilage Fungi in Food – An Overview* i Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition) 5511–5522. [Elektronisk resurs] Academic Press. Hämtad från <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.hkr.se/topics/food-science/rhizopus>
- Folkhälsomyndigheten (2016). *Sjukdomsinformation om livsmedelsburna utbrott inklusive matförgiftning*. Hämtad 2020-04-23 från: <https://www.folkhalsomyndigheten.se/smittskydd-beredskap/smittsamma-sjukdomar/livsmedelsburna-utbrott-inklusive-matforgiftning/>
- Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., & Gombert, A. K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(3), 339-354. doi:10.1007/s00253-008-1458-6
- Institute of Food Technologists for the Food and Drug Administration of the U.S. Department of Health and Human Services [FDA]. (2000). *Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies* (Volym 65 kompletterat material s8). Hämtad från <https://www.fda.gov/files/food/published/Kinetics-of-Microbial-Inactivation-for-Alternative-Food-Processing-Technologies.pdf>
- Ladaniya, M.S (2008) *Postharvest diseases and their management* i Citrus Fruit. 417–449. [Elektronisk resurs] Academic Press. Hämtad från <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.hkr.se/topics/food-science/rhizopus>

Livsmedelsverket (u.å) *Sök E-nummer*. Hämtad 2020-06-10 från:

<https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/tillsatser-e-nummer/sok-e-nummer>

Livsmedelsverket (2013) *Tillsatser i livsmedel* – en faktabok. Hämtad från:

<https://www.livsmedelsverket.se/globalassets/publikationsdatabas/broschyrer/tillsatser-i-livsmedel.pdf>

Livsmedelsverket (2015a). *Kaliumsorbat*. Hämtad 2020-04-23

från:<https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/tillsatser-e-nummer/sok-e-nummer/e-202---kaliumsorbat>

Livsmedelsverket (2015b). *Natriumbensoat*. Hämtad 2020-04-23 från:

<https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/tillsatser-e-nummer/sok-e-nummer/e-211---natriumbensoat>

Livsmedelsverket (2015c). *Bensoesyra*. Hämtad 2020-04-23 från:

<https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/tillsatser-e-nummer/sok-e-nummer/e-210---bensoesyra>

Livsmedelsverket (2019a). *Mögelgifter*. Hämtad 2020-04-23 från:

<https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/oonskade-amnen/mogelgifter>

Livsmedelsverket (2019b). *Mögelsvampar*. Hämtad 2020-04-23 från:

<https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/bakterier-virus-parasiter-och-mogelsvampar/mogelsvampar>

Livsmedelsverket (2019c). *Godkännande av tillsatser*. Hämtad 2020-05-05 från:

<https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/tillsatser-e-nummer/godkannande>

Livsmedelsverket. (2019d) *Referensmaterial för mikrobiologiska livsmedelsanalyser*.

Hämtad: 2020-05-07 från:

[https://www.livsmedelsverket.se/globalassets/produktion-handel-kontroll/laboratorieverksamhet/mikrobiologiska-referensmaterial/rm-food-2019-7---instruktion-v\\_20---sv.pdf](https://www.livsmedelsverket.se/globalassets/produktion-handel-kontroll/laboratorieverksamhet/mikrobiologiska-referensmaterial/rm-food-2019-7---instruktion-v_20---sv.pdf)

- Livsmedelsverket. (2020). *Konserveringsmedel*. Hämtad 2020-05-07 från:  
<https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/tillsatser-e-nummer/konserveringsmedel>
- Lundquist, A. och Björn, L. A (u.å). *Eukaryota organismer*. I *NE.se* Hämtad från:  
<https://www-ne-se.ezproxy.hkr.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/eukaryota-organismer>
- Machielsen, R., van Alen-Boerrigter, I. J., Koole, L. A., Bongers, R. S., Kleerebezem, M., & Van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2010). Indigenous and environmental modulation of frequencies of mutation in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 1587-1595. doi:10.1128/AEM.02595-09
- Microbiological challenge testing. (2003). *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(s2), 46-50. doi:10.1111/j.1541-4337.2003.tb00051.x
- nix Color Sensor. (u.å). Free Color Converter. Hämtad 2020-05-18 från  
<https://www.nixsensor.com/free-color-converter/>
- Ogórek, R., Lejman, A., Pusz, W., Miłuch, A., & Miodyńska, P. (2012). Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi. *Mikologia lekarska*, 19(2), 80–85. <https://www.researchgate.net/publication/233818972>
- RI.SE (u.å) *Mikrobiologiskt säkra och hållbara livsmedel*. Hämtad 2020-04-20 från:  
<https://www.ri.se/sv/vad-vi-gor/expertiser/mikrobiologiskt-saker-och-hallbar-mat>.
- Rocha, S. N., Abrahão-Neto, J., & Gombert, A. K. (2011). Physiological diversity within the *Kluyveromyces marxianus* species. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100(4), 619-630. doi:10.1007/s10482-011-9617-7
- Saltmarsh, M. (2015). Recent trends in the use of food additives in the United Kingdom. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(4), 649-652. doi:10.1002/jsfa.6715
- Sardella, D., Gatt, R., & Valdramidis, V. P. (2018). Turbidimetric assessment of the growth of filamentous fungi and the antifungal activity of zinc oxide nanoparticles. *Journal of Food Protection*, 81(6), 934-941. doi:10.4315/0362-028X.JFP-17-448

- Sangma, C., Kumar, V., Suri, S., Gat, Y., Kaushal, M., & Kumar, A. (2019). Preservation and evaluation of spiced chayote juice using hurdle technology. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22 doi:10.1590/1981-6723.12218
- Singh, S., & Shalini, R. (2016). Effect of hurdle technology in food preservation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(4), 641-649. doi:10.1080/10408398.2012.761594
- Snyder, AB & Worobo, RW (2018) Fungal Spoilage in Food Processing. *Journal of Food Protection*, volume (81) 1035-1040. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-18-031
- Spanu, C., Scarano, C., Ibba, M., Pala, C., Spanu, V., & De Santis, E. L. (2014). *Microbiological challenge testing for listeria monocytogenes in ready-to-eat food: A practical approach*. Italian Journal of Food Safety, 3(4), 4518. doi:10.4081/ijfs.2014.4518
- Sutton, S. (2011). Accuracy of plate counts. *Journal of validation technology*, 17(3), 42-46.  
<https://pdfs.semanticscholar.org/7d54/f539c31d3375c4e5ee5f205154529578424b.pdf>
- Thougaard, H., Varlund, V., & Madsen, R. M. (2012). Grundläggande mikrobiologi med livsmedelsapplikationer (2 uppl). Lund: Studentlitteratur.
- United Nations Development Programme. (2020). 12 Hållbar konsumtion och produktion. Hämtad 2020-05-08 från <https://www.globalamalen.se/om-globala-malen/mal-12-hallbar-konsumtion-och-produktion/>
- Uyttendaele, M., Rajkovic, A., Benos, G., Francois, K., Devlieghere, F., & Debevere, J. (2004). Evaluation of a challenge testing protocol to assess the stability of ready-to-eat cooked meat products against growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 90(2), 219-236. doi: 10.1016/s0168-1605(03)00305-2.
- van Gunst, A., & Roodenburg, A. J. (2019). Consumer Distrust about E-numbers: A Qualitative Study among Food Experts. *Foods*, 8(5), 178. doi: 10.3390/foods8050178.

Vetenskapsrådet. (2017). God forskningssed. Hämtad från

[https://www.vr.se/download/18.2412c5311624176023d25b05/1555332112063/God-forskningssed\\_VR\\_2017.pdf](https://www.vr.se/download/18.2412c5311624176023d25b05/1555332112063/God-forskningssed_VR_2017.pdf)

Yanase, S., Hasunuma, T., Yamada, R., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., & Kondo, A. (2010). Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(1), 381-388. doi:10.1007/s00253-010-2784-z

# Bilaga 1. Laboration med *L. plantarum*; förvaring i anaerobklocka och i aerob miljö

## Tillfälle 1:

Odlas upp *L. plantarum* från fruktdrycken hallon och granatäpple från varumärket ProViva. Stryk ut med hjälp av en plastinös direkt från förpackningen till agarplattor. Låt inkuberas två dagar i 28°C.

## Tillfälle 2:

Med hjälp av en plastinös plocka kolonier från agarplatta till MRS buljong. Låt inkuberas tre dagar i 28°C.

## Tillfälle 3:

Gör en spädningsserie: Märk 7 rör med  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  och  $10^{-7}$ . Tillsätt 9ml pepton 0,1% till samtliga rör. Tillsätt sedan 1ml från BHI buljongen till  $10^{-1}$  röret, blanda lösningen med pipett upp och ner. Fortsätt sedan i resten av spädningsserien genom att pipettera vidare 1ml till rör två, blanda, osv.

Pipettera sedan ut 100 µl från vardera spädningen till 2 agarplattor per rör (märk agarplattor med  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  osv.) En platta från varje spädningsrör inkuberas i en anaerob klocka med påse och en platta från varje rör inkuberas aerobt 28°C.

## Tillfälle 4:

Räkna kolonier på plattor mellan 10–200. Räkna tillbaka för antal CFU/ml.

## **Bilaga 2. Metod för skördning av mögel**

### **Material**

Plastinös

Agarplattor med *C. cladosporioides*

Agarplattor med *R. stolonifer*

Pepton 0,1% (20ml)

Pipett

Pipettspets

50 ml Falconrör

### **Metod**

Pipettera 10 ml pepton till Falconröret

Skörda från agarplattan med *C. cladosporioides* med hjälp av plastinös

Lös i Falconröret med pepton

Ta ny plastinös

Upprepa för samtliga plattor

Repetera med *R. stolonifer*