

Hvordan syreresistente sporedannere i syrnede mejeriprodukter kan styres

Syrnede mejeriprodukter, som ikke opbevares på køl, kræver mikrobiologisk kontrol af syreresistente sporedannere for at sikre holdbarheden.

Syrnede mejeriprodukter, det vil sige produkter med $\text{pH} \leq 4,6$, er fx yoghurt, drikkeyoghurt og smoothies. Markedet for syrnede, ikke-kølede produkter er i vækst, og produkterne eksporteres blandt andet til tempererede og tropiske områder i Mellemøsten og Sydøstasien. Samtidig ønskes en lang holdbarhed på op til et år, hvilket kan give problemer med mikrobielt fordærv forårsaget af syreresistente mikroorganismer. Det er uvist, hvor stor risikoen er for vækst uden for kølekæden i langtidsholdbare mejeriprodukter, idet der ikke er en lang historik for disse. Varmebehandling af fødevarer er en velkendt og effektiv proces til at kontrollere mikroorganismer ved at opnå en bestemt procentvis reduktion af levende celler. For ikke-syrnede produkter med $\text{pH} > 4,6$, som opbevares uden for kølekæden, er der klare varmebehandlingskrav for både patogene (fx *Clostridium botulinum*) og for fordærvende mikroorganismer (fx *Clostridium sporogenes*).

Der har hidtil ikke været defineret guidelines for varmebehandling af syrnede produkter, idet det lave pH i sig selv er en effektiv hurdle mod vækst af patogene mikroorganismer, så i praksis har forskellige varmebehandlinger været anvendt. Det kan medføre risiko for enten ikke at opnå den nødvendige drabseffekt ved for mild behandling eller modsat at 'overbehandle', hvilket kan gå ud over produktkvaliteten.

Sporedannere er mikroorganismer, der danner sporer, enten som overlevelsesstrategi hos visse bakterier eller som led i formeringen hos skimmel-svampe. Sporerne er meget modstandsdygtige over for miljøpåvirkninger som varme, syre, mm., og sporedannere har derfor større chance for at overleve varmebehandling og samtidig vokse i syrnede produkter, hvor vækstbetingelserne i ikke-kølede produkter er endnu mere favorable.

Projektet SYSPOR skulle skabe viden om, hvilke mikrobielle sporedannende fordærvere, der kan vokse i syrnede produkter, hvordan disse kan kontrolleres ved varmedrab, hvordan vækst bliver påvirket af produktformuleringer med organiske syrer og samspillet mellem varmebehandling og produktformulering. Endelig skulle resultaterne valideres under mejeri-relevante forhold.

Hvilke sporedannende mikroorganismer vokser i syrnede produkter

Der blev i begyndelsen af projektet ud fra litteraturen identificeret og skabt en kultursamling med 56 arter af bakterier og skimmelsvampe, som potentielt kan vokse i surt miljø. Heraf blev en liste på 16 forskellige arter af sporedannere udvalgt, og der blev produceret sporer herfra.

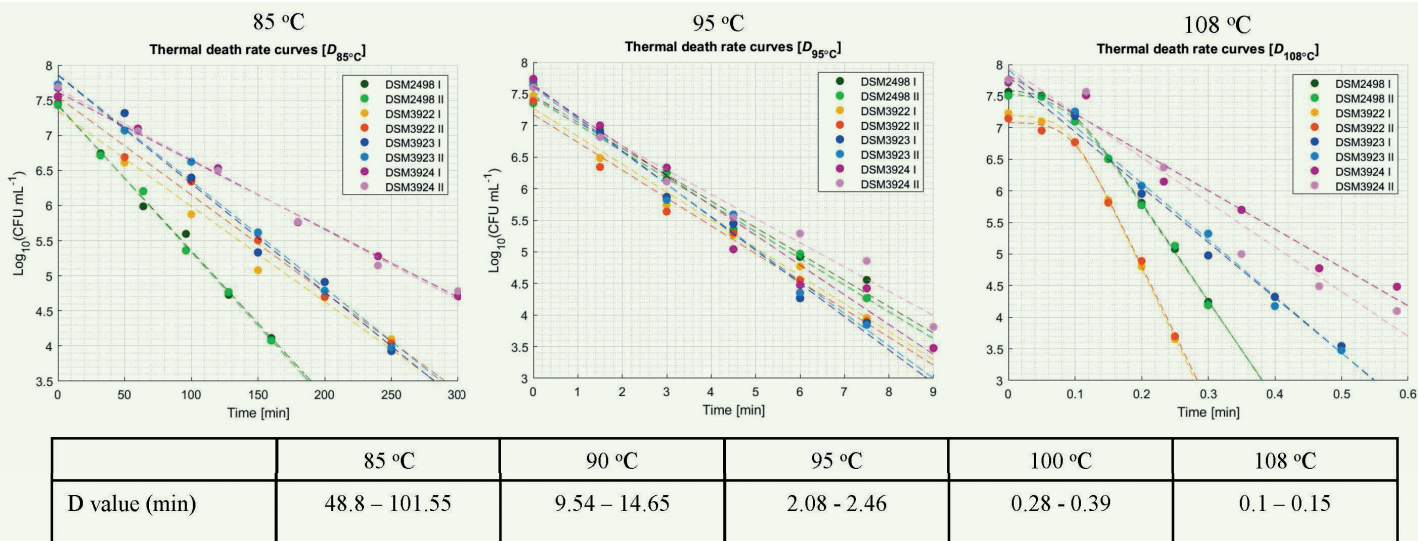
Over en 12-ugers periode blev sporenes germinering og efterfølgende vækst fulgt under opbevaringsforhold uden for kølekæden - henholdsvis 25°C og 40°C . Forsøgene blev udført ved pH 6,8 (kontrol), pH 4,6, samt ved to niveauer af mælkesyre - 0,4% og 0,8%.

Det viste sig, at alle sporerne germinerede ved pH 6,8, undtagen *Alicyclobacillus acidoterrestris*-sporer ved begge temperaturer, og *B. smithii* ved 25°C . Der var syv arter, hvis sporer germinerede og voksede ved pH 4,6; *A. acidoterrestris*, *B. megatarium* (kun ved 25°C), *B. subtilis*, *B. coagulans* (kun ved 40°C), *C. beijerrinckii*, *C. butyricum*, og *C. tyrobutyricum*. *C. tyrobutyricum*-sporerne havde en nølefase på seks uger ved 25°C og 2 uger ved 40°C .

Tilstedeværelsen af mælkesyre i begge koncentrationer i vækstmediet inhiberede sporenes vækst af alle de testede bakterier, undtagen for *A. acidoterrestris* hvis sporer germinerede og voksede ved 40°C , selvom mælkesyrekoncentrationen var høj. På



AF MARIANNE HAMMERSHØJ, PROFESSOR, INSTITUT FOR FØDEVARER, AARHUS UNIVERSITET
AMILA S. NAWARATHNA W. PAHALAGEDARA, POSTDOC, INSTITUT FOR FØDEVARER, AARHUS UNIVERSITET, NUVÆRENDE AUCKLAND UNIVERSITET, NEW ZEALAND
LASSE GLINVAD-RAVN, MASTERSTUDERENDE I BIOTEKNOLOGI, INSTITUT FOR FØDEVARER, AARHUS UNIVERSITET, NUVÆRENDE MAMMEN MEJERIERNE A/S
ELISSAVET GKOGKA, RESEARCH MICROBIOLOGIST, ARLA FOODS R&D



baggrund heraf blev fire stammer af *A. acidoterrestris* udvalgt til videre varmebehandlingsstudier.

Drab af sporer ved varmebehandling
For at inaktivere sporer skal der typisk højere varmebelastning til end for vegetative celler, hvorfor der blev udført varmebehandlingsforsøg for at bestemme decimeringstider (D-værdier) for sporene fra de fire stammer af *A. acidoterrestris* ved temperaturer fra 85-108°C. Der blev fremstillet et yoghurt-baseret medium til forsøgene for at skabe produkt-relevante forhold. Resultaterne viste, at der var relativt store forskelle på drabskurverne mellem stammerne, se figur 1. De resulterende D-værdier viste et bredt spænd, især ved den lavere temperatur, hvilket er vigtigt at være opmærksom på for at sikre sig den ønskede decimering, da forskellige stammer kan være til stede i produktet.

Formulering af produkter
Syrnede mejeriprodukter kan, udover mælkesyre, også indeholde eller tilsættes andre fødevarer-godkendte syrer. Da også visse skimmelsvampe kan vokse ved lavt pH, blev det ud fra litteraturen og erfaring fra Arla Foods besluttet at fokusere på studier af ascosporens vækst fra skimmelsvampen *Byssoschlamys*. Effekten af fire organiske syrer på væksten af endosporer af *A. acidoterrestris* og af ascosporer fra *Byssoschlamys fulva* og *Byssoschlamys nivea* blev testet for deres Minimum Inhibitoriske Koncentration (MIC) og Minimum Bactericide Koncentration (MBC), se tabel 1.

Mælkesyre viste konsistens i sin antimikrobielle effekt over for de fire stammer af *A. acidoterrestris*. MIC af kaliumsorbat var inden for det maksimale niveau i EU for fermenterede mælkeprodukter på

1 mg/mL, undtagen for stammen DSM 3923, hvor MIC var 1,6 mg/mL. Mod skimmelsvampesporerne var mælkesyre og citronsyre meget lidt effektive, mens kaliumsorbat var mest effektiv over for de to arter af *Byssoschlamys*.

Anbefalinger og validering: varmebehandling og/eller produktformulering?
De kombinerede hurdle-effekter af varmebehandling og produktformulering blev undersøgt. To varmebehandlinger kombineret med kaliumsorbat blev valideret på en drikkeyoghurt fremstillet med en spore-cocktail af de fire tidligere nævnte stammer af *A. acidoterrestris* samt skimmelsvampesporer af *Byssoschlamys fulva*. Væksten fulgtes ved 'normal' (25°C) og høj opbevaringstemperatur (40°C) over 12 uger. Resultaterne viste, at varmebehandling ved 75°C i 20 minutter med 0,8 mg/mL Kaliumsorbat kunne kontrollere væksten af *B. fulva* i op til fire og tolv uger ved henholdsvis 25°C og 40°C.

Figur 1. Eksempler på drabskurver af fire stammer af *Alicyclobacillus acidoterrestris* ved tre temperaturer i to gentagelser og de resulterende D-værdier (Pahalagedara, Gkogka, Ravn & Hammershøj, Food Control, 152, 2023, 109841).

Resume:
Projektet fokuserede på syrnede mejeriprodukter, fx yoghurt, drikkeyoghurt og smoothies, som opbevares uden for kølekæden og eksporteres til områder med tempereret eller tropisk klima. Der findes ikke retningslinjer for varmebehandling af ikke-kølede syrnede produkter. I praksis udføres varmebehandlinger, som ikke nødvendigvis sikrer mod fordærvende mikroorganismer, eller som overbehandler, hvilket kan gå ud over produktkvaliteten. Projektet har skabt viden om optimal varmebehandling og formulering af ikke-kølede syrnede mejeriprodukter for at styre væksten af syrer resistente sporedannere. Relevante mikroorganismer er blevet kortlagt, D- og Z-værdier bestemt, hurdle-effekter af organiske syrer og varmebehandling er evalueret, og de opnåede resultater er valideret.

A.acidoterrestis stamme	Mælkesyre		Citronsyre		Kaliumsorbat		Kaliumbenzoat	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
DSM 2498	8	12	44	68	0,8	1,6	0,4	1,6
DSM 3922	8	10	26	32	0,8	1,6	0,4	0,8
DSM 3923	8	48	22	32	1,6	3,2	0,8	0,8
DSM3924	8	16	24	34	0,8	1,6	0,4	0,8
Byssochlamys spp.	MIC							
	Mælkesyre		Citronsyre		Kaliumsorbat		Kaliumbenzoat	
B. fulva DSM 1808	140		>140		0,8		1,6	
B. nivea DSM 1824	120		>140		0,8		3,2	

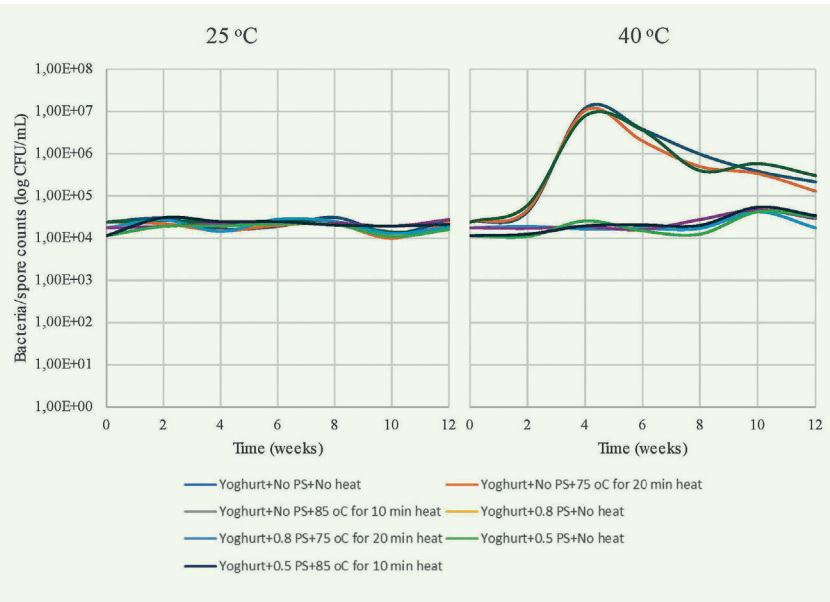
Tabel 1. Minimum Inhibitoriske Koncentration (MIC) og Minimum Bacteriocide Koncentration (MBC) af fire organiske syrer (mg/mL) over for fire stammer af *A. acidoterrestis* og MIC over for to arter af skimmelsvampen *Byssochlamys* (Pahalagedara, Gkogka, Ravn & Hammershøj, 2024, *In preparation*).

Resultaterne af de bakterielle endosporers vækst er vist i figur 2, hvor *A. acidoterrestis* ikke voksede ved 25°C og kun ved 40°C uden kaliumsorbat tilsat, hvor CFU steg med tre log-enheder inden for to til fire uger.

Konklusionen af valideringsstudiet er, at for at kontrollere vækst af syreresistente sporer af bakteriearten *A. acidoterrestis* er det nødvendigt at kombinere varmebehandling med tilsætning af kaliumsorbat, når produkterne udsættes for høje opbevaringstemperaturer.

Hvad kan det bruges til?

Projektet giver danske mejerier mulighed for at producere syrnede mejeriprodukter med lang holdbarhed uden for kølekæden, og dermed styrkes mejeriernes position på markedet for ikke-kølede produkter, især eksportmarkeder i tempererede og tropiske klimaområder. Højkvalitetsprodukter, som ikke kræver køling, betyder mindre energiforbrug og giver mejerierne et lavere klimaaftryk. Resultaterne af projektet kan anvendes i praksis på mejerierne på baggrund af valideringen af de kombinerede hurdle-effekter af varmebehandling og produktformulering. ●



Figur 2. Bakteriell vækst over 12 uger af *A. acidoterrestis*-sporer i drikkeyoghurt som funktion af varmebehandling kombineret med kaliumsorbat (PS) koncentrationer på 0; 0,5; eller 0,8 mg/ml og opbevaring ved 25°C (venstre) og 40°C (højre) (Pahalagedara, Gkogka, Ravn & Hammershøj, 2024, *In preparation*).

Projektinfo

Titel: Kontrol af syreresistente sporedannere i syrnede ikke-kølede mejeriprodukter (SYSPOR)

Projektleder: Professor Marianne Hammershøj, Institut for Fødevarer, Aarhus Universitet

Deltagere: Arla Foods amba

Projektperiode: 2021-2024

Hovedformål: At opnå viden om mest optimale varmebehandlinger og formuleringer af ikke-kølede syrnede mejeriprodukter af høj kvalitet for at kontrollere væksten af syreresistente sporedannere.

Projektet er finansieret af Mælkeafgiftsfonden og Arla Foods amba.

PROJEKTER UNDER MEJERIBRUGETS FORSKNINGSFOND