



Tillväxtinhibering på fast substrat av *Aspergillus niger*-sporer genom tillsats av sorbin-, bensoe- och fenylmjölksyra

Emma Boström

**Uppsala BioCenter
Institutionen för mikrobiologi
Fakulteten för naturresurser och
lantbruksvetenskap
Sveriges lantbruksuniversitet**

Självständigt arbete 2011:1

Uppsala

**ISSN 1101-8151
ISRN SLU-MIKRO-EX-11/1-SE**



Tillväxtinhibering på fast substrat av *Aspergillus niger*-sporer genom tillsats av sorbin-, bensoe- och fenylmjölksyra

Growth inhibition of *Aspergillus niger* spores on solid medium by addition of sorbic-, benzoic- and phenyllactic acid

Emma Boström

Handledare: Åsa Svanström
Examinator: Petter Melin

Nyckelord: *Livsmedelskvalitet, Aspergillus niger-sporer, PLA, Fast substrat, Låg sporkoncentration, pH.*

EX0427 Självtändigt arbete i livsmedelsvetenskap – magisterarbete 30 hp, nivå A1E, inom agronomprogrammet - livsmedelsinriktningen

Uppsala BioCenter
Institutionen för mikrobiologi
Fakulteten för naturresurser och
lantbruksvetenskap
Sveriges lantbruksuniversitet

Självtändigt arbete 2011:1

Uppsala

ISSN 1101-8151
ISRN SLU-MIKRO-EX-11/1-SE

ABSTRACT

Mould contamination is a problem in the food industry because it can result in poor durability and less food safety. *Aspergillus niger* is a common mould in warmer climates and is often found in imported food. *A. niger* is for example involved in the deterioration of large amount of fresh fruit and vegetables. A common preservation method to inhibit mould growth in foods is the addition of the weak organic acids sorbin and benzoic acids. These weak organic acids can create quality problems. Benzoic acid affects security because it can cause allergy and many different mould can degrade sorbic acid, resulting in decomposition products that leads to deterioration of taste. Negative food quality due to mould and preservatives demonstrates the need for alternatives. Phenyllactic acid (PLA), produced by lactic acid bacteria in sourdough bread, has been found to inhibit mould. The purpose of this study was to examine whether the weak organic acid DL-3-PLA inhibits the growth of *A. niger* spores in a similar way as the weak organic acids sorbin and benzoic acids or if PLA has other growth-inhibiting properties. The method used was solid medium, which in combination with low concentration of spores (about 25 spores/culture plate) allowed observation of individual spores. The pH was set below the pKa for each of the acid. It was concluded that PLA inhibits Ab4.1 in a similar way as sorbin and benzoic acid, that is because of the inhibited uptake of certain nutrients. A typical morphology of colonies of N402 (and in comparison with the morphology of Ab4.1) on PLA at the lower pH below the pKa is suggested to be due to a high concentration and linked to the phenyl groups. A characteristic N402 morphology thus points to an additional mechanism of inhibition than sorbin and benzoic acids.

Keywords: Food quality, *Aspergillus niger* spores, PLA, Solid media, Low concentration of conidia, pH.

SAMMANDRAG

Mögelkontaminering är ett problem inom livsmedelsindustrin eftersom den kan orsaka minskad hållbarhet och minskad säkerhet av livsmedel. *Aspergillus niger* är ett vanligt förekommande mögel i varmare klimat och hittas därför ofta i importerade livsmedel. *A. niger* kan till exempel orsaka stor förstörelse av färsk frukt och grönsaker. En vanlig konserveringsmetod för att inhibera mögeltillväxt i livsmedel är att tillsätta de svaga organiska syrorna sorbin- och bensoesyra. Dessa svaga syror skapar kvalitetsproblem. Bensoesyra påverkar säkerheten genom att det kan orsaka allergi, medan många olika mögel kan bryta ner sorbinsyra vilket resulterar i nedbrytningsprodukter som ger försämrade smak. Negativ livsmedelskvalitet på grund av mögel och konserveringsmedlen visar på behovet av alternativ. Fenylmjölksyra (PLA), som produceras av mjölksyrabakterier i surdegsbröd, har visat sig inhibera mögel. Syftet med detta examensarbete var att undersöka om den svaga organiska syran DL-3-PLA inhiberar tillväxten av *A. niger*-sporer på liknande sätt som de svaga organiska syrorna sorbin- och bensoesyra eller om PLA har andra tillväxthämmande egenskaper. Den metod som användes var odling på fast substrat, vilket i kombination med låg koncentration på sporslösningen (cirka 25 sporer/odlingsplatta) möjliggjorde observation av individuella sporer. pH ställdes för att ligga under den svaga organiska syrans pKa. Slutsatsen blev att PLA inhiberar $Ab_{4.1}$ på ett liknande sätt som sorbin- och bensoesyra, det vill säga via inhiberat upptag av vissa näringsämnen. En karaktäristisk morfologi hos kolonierna för N402 på 120 mM PLA vid lägre pH under pKa antas bero på en hög koncentration PLA och en additiv hämmande förmåga genom syrans fenylgrupp. En karaktäristisk N402 morfologi pekar därmed på ytterligare en inhiberingsmekanism än för sorbin- och bensoesyra.

Nyckelord: Livsmedelskvalitet, *Aspergillus niger*-sporer, PLA, Fast substrat, Låg sporkoncentration, pH.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

INLEDNING	9
Mjölksyrabakterier	9
<i>Aspergillus niger</i>	9
<i>Aspergillus niger</i> och svag organisk syra	10
Laborationens syfte	12
Laborationens upplägg	12
MATERIAL OCH METOD	12
RESULTAT	14
DISKUSSION	23
SLUTSATS	24
REFERENSER	26

INLEDNING

Syftet med examensarbetet har varit att undersöka om fenylmjölksyra (PLA) inhiberar tillväxten av *Aspergillus niger*-sporer på liknande sätt som konserveringsmedlen sorbin- och bensoesyra. Undersökningarna har utförts på fast substrat och med låg sporkoncentration, vilket möjliggjort observation av individuella sporer.

Det är viktigt med konservering av livsmedel för att bibehålla kvalitet under en längre tid (NE, 2010). Möjlig mat upplevs som negativ kvalitet, likaså negativa effekter på grund av tillsatser av till exempel konserveringsmedel. Positiv och negativ kvalitet har diskuterats av Kungliga Skogs- och Lantbruksakademien (KSLA) (2008). Med konservering avses alla de metoder som används för att förlänga hållbarhet och säkerhet hos ett livsmedel (NE, 2010). En vanlig konserveringsmetod för att inhibera mögeltillväxt i livsmedel är att tillsätta de svaga organiska syrorna sorbin- och bensoesyra. Dessa syror har dock nackdelar. En nackdel är att flera arter av mögel kan bryta ner sorbinsyra vilket kan resultera i sämre smak (Samson *et al.*, 2002). En annan nackdel är att bensoesyra kan ge upphov till allergi (Livsmedelsverket, 2008). Det är därför viktigt att finna alternativ. PLA kan i vissa fall vara ett sådant alternativ för till exempel mejeriprodukter och surdegsbröd. Laverimicocca *et al.*, (2003) har observerat att PLA, som producerats av mjölksyrabakterier, inhiberar mögel i surdegsbröd.

Mjölksyrabakterier

Mjölksyrabakterier har länge använts för att förbättra möjligheten till förvaring och ge karaktär åt livsmedel och ensilerat foder (Ström, 2005). De anses erfarenhetsmässigt vara säkra mikroorganismer ur ett konsumtionsperspektiv, till exempel med avseende på toxinproduktion (Melin *et al.*, 2007; Ström, 2005). Mjölksyrabakteriers produktion av bland annat svaga organiska syror resulterar i en pH-sänkning som inhiberar många mikroorganismer (Jonsson *et al.*, 2008). Idag är flera mjölksyrabakterier och deras specifika antimikrobiella ämnen identifierade. De specifika aktiviteterna mellan de inhiberande ämnena och mikroorganismerna är i de flesta fall okänt. Ytterligare forskning kan påvisa hur identifierade svampinhiberande isolat av mjölksyrabakterier verkar (Magnusson *et al.*, 2003).

Aspergillus niger

Systematik och förökningssätt

A. niger är en eukaryot, ascomycot, filamentös och, så vitt man vet, asexuell organism. Det asexuella förökningssättet hos *A. niger* orsakar bildandet av konidier eller konidiesporer. Asexuell förökning är vanligt förekommande hos ascomycota. (Schoch *et al.*, 2009) I examensarbetet görs ingen direkt skillnad mellan orden konidie, konidiespor och spor eftersom modellsvampen i denna studie, *A. niger*, bara producerar asexuella sporer.

Vanligtvis kontaminerade livsmedel

A. niger är ett vanligt förekommande mögel i varmare klimat och finns därför ofta i importerade livsmedel. Exempel på produkter där *A. niger* ofta förekommer är torkad, rökt och behandlad fisk, torkad frukt, kakaoböner, kryddor, majsprodukter, råg, korn, sojaböner,

rapsolja, ris och köttprodukter. *A. niger* är den vanligaste svampen, som hittats i nötter, speciellt i pekan- och jordnötter. Exempel på produkter där *A. niger* orsakat stor förstörelse är färsk frukt och grönsaker. (Pitt och Hocking, 1997)

Användning inom industrin

A. niger används i industrin för produktion av många önskvärda ämnen såsom citronsyra och enzymer. Citronsyra är en svag organisk syra, som används i livsmedelsindustrin för till exempel konservering. (Samson *et al.*, 2002)

Miljökrav för tillväxt

A. niger har mycket generella miljökrav för tillväxt. Den kan tillväxa i ett brett temperaturintervall på 6-47°C, men med ett optimum på 35-37°C. Dessutom har den observerats vara torktålig, speciellt vid optimumtemperaturen. Däremot har ingen större tillväxtskillnad observerats i glycerol- eller NaCl-medium, i olika vattenaktiviteter eller i pH-skillnader mellan 4.0 till 6.5. Därutöver har tillväxt observerats ner till pH 2.0 om vattenaktiviteten är tillräckligt hög. (Pitt och Hocking, 1997)

Sporer och relation till sjukdom

A. niger-sporer kan infektera en person via sporer i luften. När detta sker på grund av bland annat *A. niger* kallas infektionen Aspergillos. Beroende på person blir symtomen mer eller mindre livshotande. Det kan till exempel vara livshotande för en aidspatient. (SMI, 2010) Aspergillus svampinfektion har även uppmärksammats hos patienter som gjort lungtransplantation. Då hade lungan blivit kontaminerad med sporer. Infektionen hos dessa patienter minskade efter miljöåtgärder, det vill säga att antalet sporer i luften minskades och att medicinerings sattes in. (Patterson *et al.*, 2000) *A. niger* är en opportunistisk patogen, men mindre farlig än *Aspergillus fumigatus* (Pitt och Hocking, 1997).

Toxin

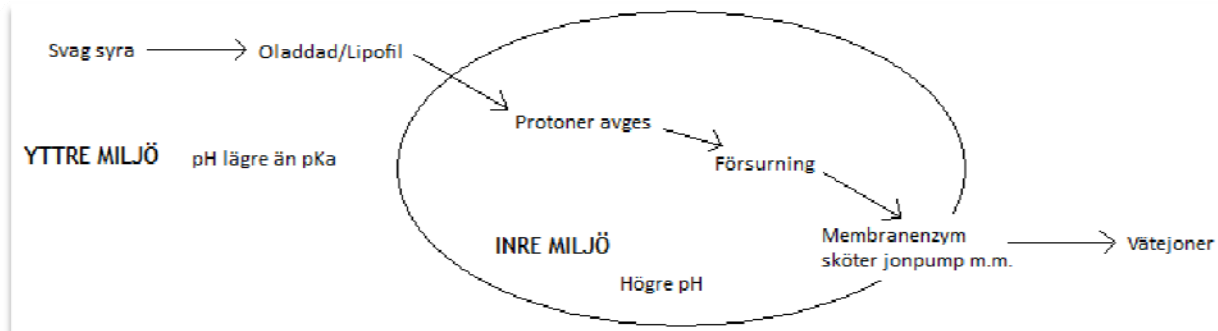
A. niger-toxinproduktion hör samman med några specifika undergrupper av *A. niger*. Toxinet Ochratoxin A finns hos vissa *A. niger*-stammar, men sett ur ett toxinperspektiv anses arten som grupp vara säker. (Pitt och Hocking, 1997; Schuster *et al.*, 2002) Ochratoxin A har till exempel visat sig vara cancerogen för råttor. Andra toxiska metaboliter som hittats är naphtho- γ -pyrones och malformnis. (Samson *et al.*, 2002) En toxisk struktur av malformin C hittades i spordamm från en specifik *A. niger*-stam som koloniserat mögelskadat ris (Anderegg *et al.*, 1975).

***Aspergillus niger* och svag organisk syra**

Teorin om försurningseffekt från svag organisk syra

Teorin om försurning är att vid ett pH lägre än den svaga syrans pKa är de flesta syramolekyler oladdade/lipofila. Detta möjliggör membranpassage till cytosolen. När den svaga organiska syran kommer in i cellens cytosol kommer den till en miljö där pH är högre,

ofta nära neutralt. Då dissocierar syran vilket orsakar en inre försurning på grund av ansamling av vätejoner. (Melin, 2009) Ansamlingen påverkar bland annat metaboliska nyckelaktiviteter i cellen till exempel genom inhibering av delreaktioner i glykolysen och därmed ATP-utbytet (Plumridge *et al.* 2004). Membranpassage ut från cellen är nu inte möjlig eftersom syran nu är laddad. Cellen kompenserar ett lägre inre pH genom att pumpa joner. Däremot finns en gräns för hur stor försurning cellen klarar av. Utpumpningen av vätejoner blir till slut inte tillräcklig och cellen kollapsar. (Stratford *et al.*, 2009; Melin, 2009) Förloppet som beskrivits i texten illustreras i figur 1.



Figur 1. Teorin om effekten av en svag organisk syra på en cell.

Stratford *et al.* (2009) visade ett behov av en utveckling av försurningsteorin genom att testa den inhiberande effekten av sorbin- och ättiksyra som båda har samma pKa. Sorbinsyra visade sig ha en mycket större inhiberande effekt än ättiksyra, vilket tyder på andra mekanismer eller i kombination med försurning.

Forskning för en ökad förståelse mellan svaga organiska syror och mögel

A. niger har förmågan att bryta ner sorbinsyra genom tillverkning av specifika enzymer. Möjligheten att bryta ner antimikrobiella ämnen gör möglet mer resistent mot ämnet. (Plumridge *et al.*, 2010) Däremot bidrar nedbrytningsprodukterna till sämre hållbarhet och försämring i smaken (Samson *et al.*, 2002).

Melin *et al.* (2008) visade bland annat att två uridin-auxotrofa¹ *A. niger*-stammar minskade i tillväxt vid tillsatts av sorbin-, bensoe- och ättiksyra. Sorbinsyra visade sig dessutom inhibera upptaget av bland annat uridin från omgivningen. Detta kan vara orsaken till en ökad känslighet för svaga organiska syror hos dessa stammar. Däremot visade flera aminosyra-auxotrofa stammar ingen ökad känslighet för syror utan gav samma resultat som en *A. niger* vildtyp. Uridin är en viktig byggsten vid tillverkning av till exempel RNA. Dessa resultat, som gjordes i flytande medium och med hög sporkoncentration, kan bidra till en ökad förståelse för relationen mellan svag organisk syra och förstörelsen av livsmedel på grund av mögel. Detta är intressant att följa upp även på fast substrat och med låg sporkoncentration för observation av enskilda sporer.

¹ Kan inte producera uridin själva utan kräver tillsats av ämnet i omgivningen.

Laborationens syfte

Att undersöka inhibering av tillväxten av *A. niger* N402 och Ab4.1 på fast substrat via:

- Sorbin- och bensoesyra och på så sätt se hur tillväxten av individuella sporer inhiberas av konserveringsmedel.
- PLA och på så sätt se om den inhiberar på samma sätt som andra svaga organiska syror och/eller om denna svaga syra har andra tillväxthämmande egenskaper.

Laborationens upplägg

Modellorganism var *A. niger* vildtyp N402 och uridin-auxotrofen Ab4.1. Den metod som användes var odling på fast substrat och låg koncentration på sporslösningen (cirka 25 sporer/odlingsplatta). pH ställdes för att ligga under den svaga organiska syrans pKa. Om det inte skedde någon tillväxt bedömdes det vara den minsta inhiberande koncentrationen (MIC). Kontrollplattorna hade pH 4 men innehöll inget inhiberande ämne. Alla odlingsplattor gjordes i 4 replikat. Faktorer som studerades efter 3, 7 och 14 dagar var MIC, antal utgroende sporer och deras morfologi.

Samma metod användes för att utreda den inhiberande effekten av lösnings- och steriliseringsmedlet metanol och steriliseringsmedlet etanol (se material och metod).

MATERIAL OCH METOD

Modellorganismer

Modellorganismer var *A. niger* vildtyp N402 och uridinauxotroph mutanten Ab4.1.

Undersökningar

1. Undersökningar av N402 och Ab4.1 och inhibering efter tillsatts av sorbin- och bensoesyra. Konserveringsmedlen löstes upp i metanol och blev en stocklösning. pH ställdes för att hamna runt 4. pKa för sorbinsyra är 4,76 och pKa för bensoesyra är 4,19 (Samson *et al.*, 2002). Kontrollplattorna hade pH 4.
2. Undersökning av Ab4.1 och inhibering genom tillsatts av DL-3-PLA, som löstes upp i metanol och blev en stocklösning. pH ställdes nära pKa. pKa för L-3-PLA är 3,46 (Wang *et al.*, 2010). Buffer användes inte i den här undersökningen, men casaamino acids i odlingsmediet anses ha en god buffrande förmåga. Kontrollplattorna hade pH 4.
3. Undersökningar gjordes på N402 för att utvärdera den inhiberande effekten av metanol och etanol. pH ställdes till 4 och plattor gjordes inom ett intervall från den lägsta till den högsta använda volymen metanol eller etanol, som fanns tillsatt i plattorna för undersökningarna på N402 och Ab4.1.
4. Undersökning av N402 och inhibering genom tillsatts av DL-3-PLA vid ett lägre och ett högre pH. PLA steriliserades i 1 ml 90 % etanol och fördes sedan över från sterilt

provrör till näringslösningen med hjälp av den autoklaverade näringslösningen. Eftersom en större mängd PLA sänker pH en del ställdes pH 2 pH-enheter över önskat slut-pH. Buffer för lägre pH var Succinat (50 mM) och pH ställdes till 6. Buffer för högre pH var MOPS (100 mM) och pH blev 8 utan ställning.

Sporförökning på malt extract agar

50 g malt extract agar (MEA) blandades med 1000 ml vatten. Sterilfiltrerad uridinlösning 1 M till Ab4.1 tillverkades och tillsattes i samband med gjutning för att få 10 mM på odlingsplattorna. Efter ympning inkuberades plattorna i 25°C och under 7 dagar innan sporer togs för de specifika försöken.

Kontroll- och odlingsplattor aspergillus complete medium

Aspergillus complete medium (ACM) består av de två huvuddelarna näringslösning och agar. ACM modifierades beroende på undersökningens syfte. Modifiering gjordes antingen i samband med plattgjutning eller vid tillverkning av näringslösningen beroende på om ingrediensen är känslig för autoklivering eller inte.

Av praktiska skäl delades näringslösningen in i två tillverkningssteg, del 1 och del 2. Del 1 gjordes 20 gånger mer koncentrerad i en separat flaska. Receptet för del 1 och 1000 ml slutvolym är 6 g NaNO₃, 0.52 g MgSO₄*7 H₂O, 0.52 g KCl, 1.52 g KH₂PO₄, 0.5 mg (1 partikel) FeSO₄*7H₂O och 0.5 g (1 partikel) ZnSO₄*7H₂O. Del 2 vägdes upp och tillverkades inför varje specifik undersökning. Recept för 1000 ml slutvolym är 1.5 g Casaamino acids, 1.5 g Yeast extract, 2.0 g Bacteriological peptone och 2.0 g Glucose. Om buffer användes vägdes det upp tillsammans med dessa ingredienser. pH ställdes till 0,25-0,35 pH-enheter lägre än önskat slut-pH eftersom en motsvarande pH-höjning observerats när agaren tillsatts. pH justerades upp med kaliumhydroxid (KOH) och ner med saltsyra (HCl). Näringslösningen separerades därefter till småflaskor. Receptet för 1000 ml slutvolym är 15 g Agar Technical No3. Uridin tillsattes i samband med plattgjutning när Ab4.1 skulle växa.

Mängden inhiberande ämnen, som skulle tillsättas för en koncentration, beräknades utifrån antaget MIC. Ledtrådar till MIC för *A. niger* N402 söktes i artiklar. För sorbinsyra användes Melin *et al.* (2008) och bensoesyrens MIC antogs ligga i närheten av sorbinsyrans MIC för N402 i närvaro av PLA togs utifrån Laverimicocca *et al.* (2003). Enligt Melin *et al.* (2008) är Ab4.1 känsligare än N402 och MIC-värden antogs utifrån detta.

Volymen metanol, som tillsattes för att göra en stocklösning (undersökning 1 och 2), var större för högre koncentration. Däremot användes en konstant mängd etanol på 1 ml per 100 ml slutvolym medium (undersökning 4).

Gjutning av plattor, 4 replikat/koncentration, skedde genom att de olika delarna blandades ihop. pH-test utfördes genom att ta en del färdigt substrat och blanda upp med avjoniserat vatten. pH mättes sedan efter cirka 1-2 dagar.

Sporlösning och inkubering

Tween 80 (gör sporer mer hydrofila) cirka 1 droppe till 200 ml och NaCl 0,9 % (fysiologiskt salthalt) gjordes i förväg. Vid tillverkningen av sporlösningen pipetterades sedan cirka 10-15 ml Tween-lösning till petriskålen med 7 dagar gamla sporer. För att lösgöra sporer till vätskan användes en rackla. Sporblandningen pipetterades över till ett sterilt provrör genom en filtertratt för att få bort mycel. Numerisk kontroll av sporlösningen gjordes i Bürkerkammare. NaCl-lösningen användes för att späda och för att uppnå önskad koncentration (250 sporer/ml → 25 sporer/100 µl). Ungefär 25 sporer spreds per platta med hjälp av rackla och snurrbord. Tillväxt och inkubering skedde i 25°C i upp till totalt 14 dagar.

Resultatdokumentering

Tillväxt på kontrollerna

- 2 -4 dagar: Räkning av utgroende kolonier och observation av deras morfologi (till exempel sporulering). Efter 4 dagar var kontrollen klar det vill säga tillväxtutrymmet utnyttjat.
- 7 och 14 dagar: Kontrollen sparades endast för att jämföra med plattorna där de inhiberande ämnena verkat. Eventuell fotografering skedde efter 14 dagar.

Tillväxt på plattor med närvaro av inhiberande ämnen

- 3, 7 och 14 dagar: Räkning av utgroende sporer kolonier och dokumentering av deras MIC och morfologi (till exempel sporulering).

RESULTAT

Undersökning N402 och Ab4.1 och inhibering efter tillsatts av sorbin- och bensoesyra

I ett första försök testade jag hur enskilda sporer påverkas av sorbin- och bensoesyra på fast substrat. Vid ett pH under pKa visades att MIC höjdes över tiden och att antalet utgroende kolonier minskade mot MIC (se tabell 1 och 2). Däremot blev morfologin mer lik kontrollens allt eftersom tiden gick och utgroningen kom igång hos kolonierna närmare MIC (för exempel se figurerna 1a-c och 2a-c). MIC för N402 och Ab4.1 blev lägre på fast substrat med mer enskilda sporer än i flytande med högre sporkoncentration (se Melin *et al.*, 2008).

Tabell 1. N402 på kontrollplattor samt i närvaro av olika koncentrationer sorbin- och bensoesyra vid pH 4.

Dar ²	Sorbin			Sporer ⁶	Bensoe		
	Konc ³	Medel ⁴	Standardav ⁵		Medel	Standardav	Sporer
4	Kontroll	27,25	5,14	Ja	10	1,58	Ja
3	1,25				13,25	3,96	Nej
	1,5	9,25	4,55	Nej	12,25	2,77	Nej
	1,75	MIC ⁷			4,75	1,64	Nej
	2				MIC		
7	1,25				13,25	3,96	Ja
	1,5	14,75	3,56	Ja	12,25	2,77	Ja
	1,75	14,5	3,64	Ja	8	1,87	Ja
	2	8,75	1,92	Ja	4	1,87	Ja
	2,25	5,25	2,49	Ja	5,5	2,29	Ja
	2,5	1,75	1,48	Ja	MIC		
	2,75	MIC					
14	1,25				13,25	3,54	Ja
	1,5	14,75	3,56	Ja	12,25	2,48	Ja
	1,75	14,5	3,64	Ja	8	1,67	Ja
	2	9	1,73	Ja	4	1,67	Ja
	2,25	7,5	2,18	Ja	5,5	2,05	Ja
	2,5	6,25	0,83	Ja	MIC		
	2,75	3,75	1,09	Ja			
	3	0,25	0,43	Nej			
3,25	MIC						

² Tiden är antalet dagar efter sporspridningen.

³ Konc är koncentrationen av inhiberande ämne i mM.

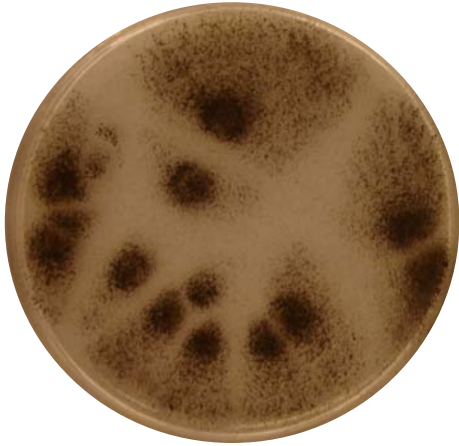
⁴ Medelvärde är beräknat på antalet kolonier av fyra replikat.

⁵ Standardavvikelsen är beräknat mellan antalet kolonier på de fyra replikaten.

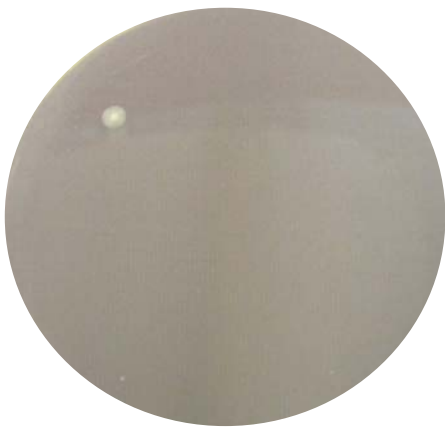
⁶ Sporer är en notering om sporulering skett. Ja innebär att sporulering har skett på en eller flera kolonier. Nej innebär att ingen koloni har sporulerat.

⁷ MIC är den minsta inhiberande koncentrationen där ingen koloni vuxit.

Figur 1a. N402 på kontrollen efter 14 dagar.



Figur 1b. N402 i närvaro av sorbinsyra 3 mM löst i cirka 60 µl metanol efter 14 dagar.



Figur 1c. N402 i närvaro av bensoesyra 2,25 mM löst i cirka 45 µl metanol efter 14 dagar.



Tabell 2. Ab4.1 på kontrollplatta samt i närvaro av olika koncentrationer sorbin- och bensoesyra vid pH 4.

Dar	Sorbin			Sporer	Bensoe		
	Konc	Medel	Standardav		Medel	Standardav	Sporer
4	Kontroll	14	1,87		36	9,35	Ja
3	0,05	10,5	3,2	Nej			
	0,1	5	0,71	Nej	31,25	1,09	Nej
	0,15	0,75	0,83	Nej			
	0,2	MIC			6,75	5,26	Nej
	0,25						
	0,3				MIC		
7	0,05	10,75	3,03	Ja			
	0,1	7,5	0,87	Ja	32,25	0,43	Ja
	0,15	4	3,08	Ja			
	0,2	0,25	0,43	Nej	17,75	7,26	Ja
	0,25	0,25	0,43	Nej			
	0,3	MIC			0,75	1,30	En
	0,4				MIC		
14	0,05	10,75	2,71	Ja			
	0,1	7,5	0,77	Ja	32,25	0,43	Ja
	0,15	4,5	2,93	Ja			
	0,2	0,75	0,39	Ja	17,75	7,26	Ja
	0,25	0,75	0,74	Ja			
	0,3	0,25	0,39	Ja	2,25	0,43	Ja
	0,4				1,25	0,83	Ja
	0,5				MIC		

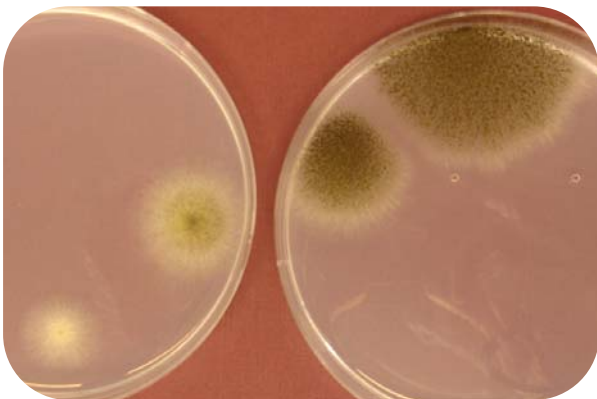
Figur 2a. Ab4.1 på kontrollen efter 14 dagar.



Figur 2b. Ab4.1 i närvaro av sorbinsyra 0,3 mM löst i cirka 60 µl metanol efter 14 dagar.



Figur 2c. Ab4.1 i närvaro av bensoesyra 0,4 mM löst i cirka 13 µl metanol efter 14 dagar. Bilden visar att kolonier mellan plattor inom samma koncentration kan ha olika utveckling i morfologi vilket är en generell observation för alla undersökningar för N402 och Ab4.1.



Undersökning av Ab4.1 och inhibering genom tillsatts av DL-3-PLA

I följande försök testades hur enskilda sporer påverkas av PLA på Ab4.1 vid ett pH under pKa för att se om PLA skulle sänka MIC på ett liknande sätt som sorbin- och bensoesyra (se tabell 2). Resultaten visade att MIC höjdes över tiden (se tabell 3). Utgroningen av kolonier närmare MIC skedde allt eftersom tiden gick och morfologin hos dessa kolonier blev mer lik kontrollens (för exempel se figur 3). Däremot behövdes en högre koncentration PLA än sorbin- och bensoesyra för att erhålla ett MIC på fast substrat (se tabell 3).

Tabell 3. Ab4.1 på kontrollplattor samt i närvaro av olika koncentrationer PLA vid ett pH runt pKa.

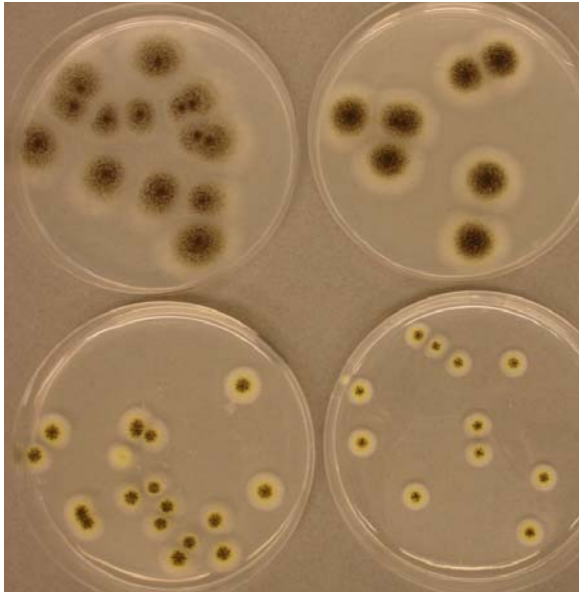
Dar	Konc	Medel	Standardav	Sporer
4	Kontroll	14	1,87	Ja
3	5	12,75	2,28	Nej
	10	8,5	3,91	Nej
	15	1	0	Nej
	20	MIC		
7	5	13,25	2,05	Ja
	10	11,25	2,68	Ja
	15	4,5	1,5	Ja
	20	MIC		
14	5	13,5	2,05	Ja
	10	11,25	2,4	Ja
	15	4,5	1,34	Ja
	20	1	0,89	Ja
	25	MIC		



Figur 3. Ab4.1 i närvaro av PLA 20 mM (löst i cirka 200 µl metanol/platta) efter 14 dagar.

Undersökning på N402 för att utvärdera den inhiberande effekten av metanol

Undersökningen utfördes för att det fanns en misstanke om att en högre volym metanol bidrog till den inhiberande effekten. Eftersom PLA är mindre toxisk så krävdes det en mycket högre volym metanol för att lösa denna substans och göra en stocklösning till N402. Anledningen till att undersökningen gjordes var för att eliminera risken att det är lösningsmedlet som hämmar snarare än PLA. Resultaten visade att en högre volym metanol hade en inhiberande effekt med avseende på diametern hos N402, men inte på antalet utgroende kolonier (se figur 4).

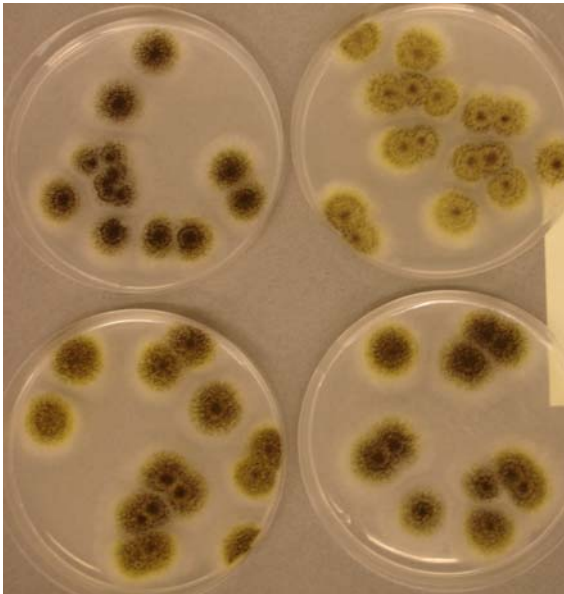


Figur 4. N402 på plattor, efter 4 dagar, där olika volymer av metanol tillsattes. Tillsatt volym metanol i plattan högst upp till vänster var 25 µl, i plattan högst upp till höger 300 µl, i plattan längst ner till vänster 600 µl och i plattan längst ner till höger 900 µl. En tydlig effekt med avseende på radiella tillväxten visade sig vid de högre koncentrationerna. Däremot skedde det inte någon skillnad i antalet kolonier som tillväxte.

Undersökning på N402 för att utvärdera den inhiberande effekten av etanol

Metoden för att undersöka den inhiberande effekten av PLA på N402 modifierades därmed från att använda metanol (stocklösning) till att använda etanol (steriliserande funktion). Etanolens inhiberande effekt på N402 undersöktes på samma sätt som metanolen.

Undersökningen visade att etanol hade en mindre inhiberande effekt med avseende på morfologin än metanol hos N402 (se figur 5). Antalet utgroende kolonier påverkades minimalt, på samma sätt som metanolen.



Figur 5. N402 på plattor, efter 4 dagar, där olika volymer av etanol tillsatts. Tillsatt volym etanol i plattan högst upp till vänster var 100 µl, i plattan högst upp till höger 200 µl, i plattan längst ner till vänster 300 µl och i plattan längst ner till höger 400 µl. Antalet kolonier påverkades inte utan var generellt lika mellan koncentrationerna.

Undersökning av N402 och inhibering genom tillsatts av DL-3-PLA vid lägre och högre pH

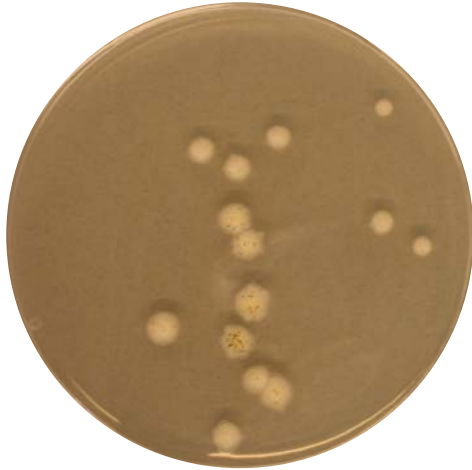
Vid följande undersökningar testades skillnaden i den inhiberande effekten med avseende på MIC, antal utgroende kolonier och morfologi av PLA på N402 vid ett pH lägre och högre än pKa. Detta är av intresse för att testa om pH har någon betydelse för en inhiberande effekt. Dessutom är det intressant att se om det krävs en högre koncentration PLA för N402 än för Ab4.1.

Resultaten vid ett pH under pKa visade att MIC höjdes över tiden (se tabell 4). MIC för N402 på PLA vid pH lägre än pKa blev högre än för Ab4.1 (se tabell 3 och 4). Resultatet för N402 på den högsta koncentrationen PLA vid ett pH under pKa visade en karaktäristisk morfologi (för exempel se figur 6a) jämfört med alla andra undersökningar vars morfologi liknade den hos kontrollen (för exempel se figurerna 1-6). N402 på den högsta koncentrationen PLA vid pH över pKa hade tillväxt och morfologin liknade den hos kontrollen (för exempel se figur 6b). Det krävdes en högre koncentration PLA för att erhålla MIC hos N402 vid pH lägre än pKa jämfört med sorbin- och bensoesyra, det vill säga PLA är mindre effektivt.

Tabell 4. N402 på kontrollplattor samt i närvaro av olika koncentrationer PLA vid ett planerat lägre och högre pH än pKa. Däremot gick det inte att erhålla lika pH vid de olika koncentrationerna även i närvaro av använda buffrar.

Dar	Lägre				Sporer	Högre			
	Konc	pH ⁸	Medel	Standardav		pH	Medel	Standardav	Sporer
4	Kontroll	4	16,25	2,86	Ja	6	13,75	4,49	Ja
3	30	4,9	13,75	3,19	Ja	6,7	10,5	1,66	Ja
	60		11,5	3,28	Ja	6,8	14	2,74	Ja
	90		11,5	1,8	Nej	5,4	15,25	3,63	Ja
	120	3,8	MIC		4,4	9,5	4,15	Ja	
7	30		13,75	3,19	Ja		10,5	1,66	Ja
	60		11,5	3,28	Ja		14	2,74	Ja
	90		11,75	1,92	Lite		15,25	3,63	Ja
	120		7,5	2,96	Nej		9,5	4,15	Ja
14	30		13,75	2,85	Ja		10,5	1,66	Ja
	60		11,5	2,93	Ja		14	2,74	Ja
	90		11,75	1,72	Ja		15,25	3,63	Ja
	120		10	2,10	Lite		9,5	4,15	Ja

⁸ Angivet pH är det ursprungliga.



Figur 6a. N402 i närvaro av PLA 120 mM steriliserat i 1 ml (cirka 200 μ l/platta eller slutkoncentration 1 %) 90 % etanol vid ett lägre pH efter 14 dagar gav en karaktäristisk morfologi. Enstaka, mer koncentrerade och bolliknande sporuleringsansamlingar, går att observera på kolonierna. Jämför figur 6b där sporuleringen ser mer dammig ut på grund av fler och mindre sporansamlingsbollar.



Figur 6b. N402 i närvaro av PLA 120 mM steriliserat i 1 ml (cirka 200 μ l/platta eller slutkoncentration 1 %) 90 % etanol vid ett högre pH efter 14 dagar.

DISKUSSION

I detta arbete har jag visat att sorbin-, bensoesyra och PLA hade en inhiberande effekt vid pH under pKa genom att ett MIC erhöles (vid ett tillfälle eller flera tillfällen) för både N402 och Ab4.1. Ett undantag var N402 i närvaro av PLA vid ett högre pH över pKa då inget MIC prickades. Morfologin hos N402 på den högsta koncentrationen (120 mM) PLA vid ett högre pH liknade den hos kontrollen jämfört med morfologin vid ett lägre pH. Detta var en viktig upptäckt då det visar att den morfologiska förändringen är direkt beroende på koncentrationen. En morfologisk förändring beroende på koncentrationen förstärktes genom att en jämförelse gjordes med morfologin hos Ab4.1 på den högsta koncentrationen PLA vid pH lägre än pKa som hade morfologi liknande den hos kontrollen.

Den karaktäristiska morfologin hos N402 på PLA vid pH lägre än pKa kunde vara ett tecken på minskad återhämtning till exempel på grund av fenylgruppen och/eller den höga koncentrationen. För att uppnå denna morfologi krävdes en hög koncentration PLA. På ett liknande sätt fann Stratford *et al.*, (2009) att det krävdes en hög koncentration ättiksyra för att uppnå ett MIC hos groende *A. nigersporer*. Stratford *et al.*, (2009) kom fram till att inhiberingen orsakades av försurning genom att cytosolens pH mättes.

Koncentrationen sorbin-, bensoesyra och PLA, som behövdes för ett MIC vid pH under pKa, var lägre för Ab4.1 än för N402. Detta kan förklaras genom sambandet med inhiberingen av upptaget av bland annat uridin som hämmas av alla testade svaga organiska syror (Melin et al., 2008). PLA på Ab4.1 kan därför antas ha samma effekt.

Relationen mellan metod och felkällor

Två viktiga faktorer i laborationens metod var bland annat pH och val av lösningsmedel eller steriliseringsmedel till de inhiberande ämnena. Det är mest tillförlitligt och praktiskt att använda stocklösning, men en konsekvens är att en större volym metanol påverkade morfologin med avseende på diameter. Den låga koncentrationen metanol som användes för sorbin- och bensoesyra antogs inte påverka diametern. Bytet till metoden då etanol användes visade sig ge mindre effekt på diametern, men hade emellertid brister i det praktiska.

Eftersom PLA har ett lägre pKa än de andra syror bör man testa PLA vid ett lägre pH det vill säga runt pH 3.

SLUTSATS

Genom examensarbetets forskning kan följande slutsatser dras.

PLA inhiberar Ab4.1 på ett liknande sätt som sorbin- och bensoesyra genom att de svaga organiska syror resulterade i en liknande morfologi. Detta antas bero på att de svaga organiska syror inhiberar bland annat upptaget av uridin vilket ger ett lägre MIC i jämförelse med N402.

Den karaktäristiska morfologin hos kolonierna för N402 på PLA vid lägre pH under pKa (och i jämförelse med Ab4.1) tyder på en annan inhiberingsmekanism än för sorbin- och bensoesyra vid pH under pKa. Den lägre koncentration som krävdes för att förhindra att Ab4.1-sporerna grodde ut kan antas vara för låg för att ge upphov till de morfologiska förändringarna. Slutsatsen blir att PLA hämmar dels genom att vara en svag organisk syra men vid höga koncentrationer påverkar syran också morfologin och sporuleringen av möglet *A. niger*. Morfologiförändringen på grund av PLA kan antas bero på en koppling till fenylgruppen.

TACK!

Åsa Svanström för god handledning.

Petter Melin för god opponering och examination.

Institutionen för mikrobiologi vid SLU för en god arbetsmiljö.

Till er som deltog vid min redovisning och bidrog till en bra diskussion.

REFERENSER

- Anderegg, R.J. Biemann, K. Biichi, G. Cushman, M. (1975). Malformin C, a new metabolite of *Aspergillus niger*. Contribution from the department of chemistry, Massachusetts institute of technology, Cambridge, Massachusetts.
- Jonsson, L. Marklinder, I. Nydahl, M. Nylander, A. (2008). Livsmedelsvetenskap. Printed by Elanders Hungary Kft. ISBN 978-91-44-04346-3.
- KSLA, Kungl. Skogs- och Lantbruksakademien Kommittén för matkvalitet och folkhälsa (2008). Matens kvalitet. Halmstad tryckeri. ISBN 978-91-85205-67-7.
- Lavermicocca, P. Valerio, F. Visconti, A. (2003). Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. Applied and environmental microbiology, 634-640.
- Livsmedelsverket. (2008). Tillsatser i livsmedel. 4e upplagan. AB Danagårds grafiska 2009.
- Magnusson, J. Ström, K. Roos, S. Sjögren, J. Schnurer, J. (2003). Broad and antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS microbiology letters 219, 129-135.
- Melin (2009) i Livsmedel i fokus. (2009:5). Konserveringsmedel effektiva mot mögel. Markaryds grafiska AB.
- Melin, P. Stratford, M. Plumridge, A. Archer D.B. (2008). Auxotrophy for uridine increases the sensitivity of *Aspergillus niger* to weak-acid preservatives. Microbiology, 154, 1251-1257.
- Melin, P. Sundh, I. Håkansson, S. Schnurer, J. (2007). Review article: Biological preservation of plant derived animal feed with antifungal microorganisms: Safety and formulation aspects. Biotechnol. Lett 29: 1147-1154.
- NE. Nationalencyklopedins hemsida. (2010). www.ne.se/konservering/1151242
- Patterson, J.E. Peters, J. Calhoon, J.H. Levine, S *et al.* (2000). Investigation and control of aspergillosis and other filamentous fungal infections in solid organ transplant recipients. Transpl Infect Dis Mar 2(1):22-8.
- Pitt, J.I. & Hocking, A.D. (1997). Fungi and food spoilage 2nd ed. London: Blackie academic press and professional. ISBN 0412554607.
- Plumridge, A. Melin, P *et al.* (2010). The decarboxylation of the weak-acid preservative, sorbic acid, is encoded by linked genes in *Aspergillus* spp. Fungal genetics and biology, 47(8):683-692.
- Samson, R.A. Hoekstra, S.E. Frisvad, C.J. Filtenborg, O. (2002). Introduction to food- and airborne fungi 6th ed. Ponsen & Looyen, Wageningen, The Netherlands. ISBN 9070351420.

Schoch, C. L *et al.* (2009). The Ascomycota Tree of Life: A Phylum-wide Phylogeny Clarifies the Origin and Evolution of Fundamental Reproductive and Ecological Traits. *Systematic biology* 58(2): 224-239.

Schuster, E. Dunn-Coleman, N. Frisvad, J.C. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Appl microbial biotechnol*, 59:426-435.

SMI. Smittskyddsinstitutets hemsida. (2010).
www.smittskyddsinstitutet.se/sjukdomar/aspergillos/

Stratford, M. Plumridge, A. Nebe-von-Caron, G. Archer, D.B. (2009). Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. *International journal of food microbiology* 136, 37-43.

Ström, K. (2005). Fungal inhibitory lactic acid bacteria. Characterization and application of *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393. PhD thesis. Swedish university of agricultural sciences.

Wang, J.P. Lee, J.H. Yoo, J.H. *et al.* (2010). Effects of phenyllactic acid on growth performance, intestinal microbiota, relative organ, weight, blood characteristics, and meat quality of broiler chicks. *Poult Sci*, 89: 1549-1555.