

Inläggning, gravning, syrning och konservering

Riskvärderingsrapport

av Karin Nyberg

Innehåll

| | |
|---|----|
| Förord | 3 |
| Sammanfattning | 4 |
| Summary..... | 5 |
| Inledning | 6 |
| Övergripande frågeställning | 6 |
| Specifika frågor | 6 |
| Metod | 7 |
| Söksträngar | 7 |
| Faroidentifiering | 8 |
| Clostridium botulinum..... | 8 |
| Listeria monocytogenes..... | 9 |
| Farokarakterisering..... | 10 |
| Clostridium botulinum..... | 10 |
| Listeria monocytogenes..... | 10 |
| Exponeringsuppskattning | 11 |
| Sänkning av vattenaktivitet med salt och socker | 11 |
| Sänkning av pH med ättiksyra | 12 |
| Tillväxthämning av Clostridium botulinum sporer och toxin | 13 |
| Proteolytisk Clostridium botulinum | 13 |
| Icke-proteolytisk Clostridium botulinum..... | 13 |
| Botulinumtoxin | 15 |
| Tillväxthämning av Listeria monocytogenes | 15 |
| Förekomst av Clostridium botulinum i fisk..... | 16 |
| Inläggning av sill..... | 16 |
| Gravning av lax | 18 |
| Hemsyrning av grönsaker | 20 |
| Värmekonsivering av grönsaker och svamp | 21 |
| Riskkarakterisering | 22 |
| Fråga om fiskinläggningar..... | 22 |
| Svar om fiskinläggningar..... | 22 |
| Fråga om typ av salt vid gravning av fisk..... | 23 |
| Svar om typ av salt vid gravning av fisk..... | 24 |
| Fråga om värmekonsivering och hemsyrning..... | 24 |
| Svar om värmekonsivering och hemsyrning..... | 25 |
| Referenser | 26 |

Kvalitetsgranskare: Jakob Ottoson och Mia Egervärn

ISSN 1104-7089

Förord

Livsmedelsverket arbetar för att skydda konsumenternas intressen genom att arbeta för säker mat och bra dricksvatten, att informationen om maten är pålitlig så ingen blir lurad och för att främja bra matvanor.

En av Livsmedelsverkets uppgifter är att ta fram och förvalta olika konsumentråd som rör livsmedel och dricksvatten. Råden baseras på vetenskapliga rön och behöver löpande uppdateras.

Livsmedelsverkets rapport nr 8-2017 om inläggning, gravning och konservering består av två delar, där del 1 är en riskhanteringsrapport och del 2 är en oberoende riskvärdering eller ett kunskapsunderlag.

I denna rapport del 2 redovisas en riskvärdering som är uppdaterad utifrån aktuellt kunskapsläge i ämnet. Den har tagits fram och sammanställts av Livsmedelsverkets experter inom området mikrobiologi.

Rapporten har tagits fram på beställning av Livsmedelsverkets Rådgivningsavdelning och besvarar både allmänna samt specifika frågeställningar. Den är uppdelad i faroidentifiering, farokarakterisering, exponeringsuppskattning och riskkarakterisering, där de specifika frågeställningarna besvaras. I riskvärderingen ingår inte åtgärdsförslag till hur eventuella risker ska hanteras. Det redovisas i motsvarande riskhanteringsrapport.

Följande personer har arbetat med att ta fram denna rapport: Karin Nyberg, mikrobiolog, Jakob Ottoson, mikrobiolog och Mia Egervärn, mikrobiolog

Livsmedelverket oktober 2017

Sammanfattning

Detta underlag behandlar mikrobiologiska risker som kan uppkomma i samband med inläggning och gravning av fisk samt hemsyrning och hemkonservering av grönskaker. Rätt utfört kan dessa metoder både förädla och förlänga hållbarheten på livsmedel.

Om de däremot utförs på ett felaktigt sätt kan förskämmande och sjukdomsframkallande mikroorganismer växa till i livsmedlet. Frågor som besvaras är hur olika koncentrationer ättiksyra, salt och socker som sammantaget förhindrar *Clostridium botulinum* samt *Listeria monocytogenes* att växa till i inlagd sill, samt om mineralsalt kan ersätta vanligt hushållssalt vid gravning av lax. Dessutom besvaras frågor rörande hur syrning och hemkonservering bör utföras för att förhindra tillväxt av *Clostridium botulinum*.

Summary

This scientific report describes microbiological risks associated with some different methods for home conservation of fish and vegetables. Home conservation is an ideal method for preserving food, but if not done correctly unwanted and hazardous microorganisms can potentially be able to multiply in the food. The report describes how different concentrations of acid, salt and sugar inhibit growth of *Clostridium botulinum* and *Listeria monocytogenes* in fish and if mineral salt can be used as a safe alternative to ordinary salt. In addition pickling and home canning of vegetables without the risk of growth of *Clostridium botulinum* is described.

Inledning

Inläggning och gravning av fisk samt hemsyrning och hemkonservering av grönskaker är metoder som används för att förädla och förlänga hållbarheten på livsmedel. Om de utförs på ett felaktigt sätt kan dock förskämmande och sjukdomsframkallande mikroorganismer växa till i livsmedlet.

Övergripande frågeställning

Den övergripande frågeställningen har varit att ta fram ett vetenskapligt underlag till Livsmedelsverket angående inläggning och gravning av fisk samt hemsyrning och värmekonservering av grönsaker och svamp.

Specifika frågor

1. Rådet att enbart följa beprövade sillinläggningsrecept baseras på gammal hävd, praktisk erfarenhet och avsaknad av kunskap om var den nedre gränsen för koncentrationen ättiksyra, salt och socker går för att sporer av *Clostridium botulinum* inte ska gro och tillväxa.
 - a. Vilka andra relevanta biologiska hälsoräror än *Clostridium botulinum* kan förekomma i klassiskt inlagd sill?
 - b. Utgå från färdig inläggningssill och ta fram vilka olika koncentrationer av ättiksyra och socker som sammantaget förhindrar att botulinum-sporer gro och tillväxer i den färdiga inlagda sillfilén. Ta hänsyn till hur salt och socker påverkar vattenaktiviteten och till att sillfilén i sig kan påverka pH i hela inläggningen. Redovisa gärna svaret i diagramform och omvandla ättiksyran till ättikssprit (12 %).
 - i. Eftersom kylskåpstemperaturer varierar mellan hushåll, ange tillväxtmöjligheterna för de olika pH-vattenaktivitetskombinationerna vid 5, 8, 10 och 12 °C.
 - ii. Hur påverkas tillväxtmöjligheten av andra surgörare som till exempel sherryvinäger?
 - c. Färdig inlagd sill bör förvaras kylskåpskallt. Hur länge kan hemgjord inlagd sill kylförvaras vid olika kyltemperaturer och ändå betraktas som säker med avseende på *Clostridium botulinum*? Gör, om möjligt, tillväxtberäkningar för temperaturerna (4), 5, 6, 8, 10 och 12 °C samt variera pH-värde och vattenaktivitet motsvarande de tre sill-sorterna:
 - i. Klassisk inlagd sill i klar ättikslag
 - ii. Senapssill
 - iii. Majonnäs och gräddfil/crème fraiche-baserad sill (t. ex. skärgårdssill)

2. Koncentrationen natriumklorid är lägre i mineralsalt (t.ex. seltin och havssalt) än i vanligt salt.
 - a. Hur påverkas den mikrobiologiska säkerheten och kvaliteten om man använder mineralsalt istället för natriumklorid till att grava fisk? Beakta de bakteriella farorna *Listeria monocytogenes* och *Clostridium botulinum* samt förskämningsorganismer som exempelvis relevanta arter av mjölksyrabakterier.
 - b. Går det att kompensera för den lägre koncentrationen natriumklorid i mineralsalt genom att öka mängden utan att påverka den mikrobiologiska säkerheten?
3. Hur förhindrar man att botulinum-sporer gror och sen förökar sig i färdiga produkter av:
 - a. Hemsyrade grönsaker, till exempel surkål och rotsaker.
 - b. Hemkonservering av grönsaker, till exempel tomat, paprika, squash eller lök.
 - c. Hemkonserverad svamp.

Metod

Underlaget bygger på vetenskaplig data från publicerad litteratur, på egen bearbetning av data som tagits fram i publicerade studier samt ett mindre laborativt försök. Dessutom har facklitteratur används och sökningar gjorts utifrån referenslistor i reviewartiklar.

Söksträngar

Sökningar har utförts i databaserna PubMed och FSTA. Artiklar har valts ut baserat på titel följt av abstract. Följande söksträngar har använts:

1. clostridium botulinum AND food AND (pH OR salt) AND (inhibition OR growth)
2. sodium AND potassium AND chloride AND (clostridium botulinum OR listeria)
3. (canning OR pickling OR fermentation) AND clostridium botulinum

Faroidentifiering

Fisk kan innehålla en rad olika sjukdomsframkallande bakterier, som kan komma ifrån dess naturliga miljö eller från senare hantering. Det är således inte ovanligt att fisk innehåller såväl parasiter, såsom nematodmaskar inom släktet *Anisakis* spp. (EFSA, 2010), och sjukdomsframkallande bakterier, exempelvis *Vibrio* spp., *Listeria monocytogenes* och *Aeromonas* spp. (Davies et al., 2001; Feldhusen, 2000; Novotny et al., 2004).

Den allvarligaste faran när det kommer till livsmedel som ska kylförvaras och inte hettas upp före konsumtion, vilket inkluderar inlagd och gravad fisk, anses dock vara det toxin som bildas vid tillväxt av *Clostridium botulinum* (Peck, 2010). För känsliga individer kan även *Listeria monocytogenes* utgöra en fara, framför allt i förädlade kylvaror med lång hållbarhetstid såsom gravad lax (Feldhusen, 2000; Mizan et al., 2015). *Clostridium botulinum* är också den allvarligaste faran som kopplats samman med hemkonservering av grönsaker (Peck, 2010; USDA, 2015). Därför är det dessa bakterier som är i fokus i denna riskvärdering. Tabell 1 visar de tillväxthämmande betingelser som anges för *Clostridium botulinum* och *Listeria monocytogenes*.

Tabell 1. Gränser för tillväxt för *Clostridium botulinum* typ I och II, samt *Listeria monocytogenes* och temperatur för inaktivering av sporer enligt Ihekwa et al. (2016) samt Adams och Moss (2008).

| | Proteolytisk ^a <i>C. botulinum</i> (typ I) | Icke-proteolytisk <i>C. botulinum</i> (typ II) | <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> |
|--|---|--|---|
| Neurotoxin som bildas | A, B, F | B, E, F | - ^b |
| Optimal temp för tillväxt (°C) | 37-42 | 25-30 | 35 |
| Minimum temp för tillväxt ^c (°C) | 10-12 | 2,5-3 | 0,4 |
| Minimum pH för tillväxt ^c | 4,6 | 5,0 | 4,4 |
| Minimum vattenaktivitet för tillväxt (NaCl) ^c | 0,94 | 0,97 | 0,92 |
| NaCl konc som kraftigt hämmar tillväxt (%) | 10 | 5 | 12 |
| Värmetolerans för sporer (minuter) | D _{121°C} = 0,21 | D _{82,2°C} = 2,4 | - ^b |

^a Termen proteolytisk syftar till bakteriernas förmåga att bryta ner protein

^b *Listeria monocytogenes* bildar inte toxin eller sporer

^c Förutsätter att förhållanden i övrigt är optimala för tillväxt

Clostridium botulinum

Clostridium botulinum är en anaerob bakterie som består av fyra olika serotyper (typ I-IV) som förenas genom sin förmåga att producera botulinumtoxin. Det finns sju olika botulinumtoxiner (A-G), men det är endast botulinumtoxin A, B och E som orsakar förgiftning hos människor. Dessa botulinumtoxiner produceras av *Clostridium botulinum* typ I och typ II (Adams and Moss, 2008; Collins and East, 1998). *Clostridium botulinum* typ I består av proteolytiska stammar, och dessa har tillväxtoptimum vid cirka 37 °C och producerar mycket värmetåliga sporer. *Clostridium*

botulinum typ II består av icke-proteolytiska stammar, och dessa har tillväxtoptimum vid lägre än 30 °C och producerar mindre värmetåliga sporer. Icke-proteolytiska *Clostridium botulinum* är känsligare för salt än proteolytiska stammar, och hämmas vid en koncentration på 5 procent natriumklorid jämfört med 10 procent för proteolytiska stammar (Adams and Moss, 2008; Doyle and Glass, 2010).

Clostridium botulinum förekommer naturligt i olika jord- och vattenmiljöer, och kan således finnas i eller på såväl fisk som grönsaker (Lindström et al., 2006). I miljön befinner sig bakterien ofta i sporform, ett vilostadium i vilken den är mycket tålig för olika yttre faktorer. Toxinet bildas när sporena övergår i vegetativ form och börjar växa. Icke-proteolytiska *Clostridium botulinum* kan växa i kylskåpstemperatur och därmed utgöra en fara vid inläggning och gravning av fisk, medan de proteolytiska stammarnas värmetåliga sporer kan utgöra en fara vid värmekonsivering om tillräcklig tid och temperatur inte uppnås (Peck, 2006).

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes är en fakultativt anaerob bakterie som orsakar sjukdomen listerios. *Listeria* delas idag upp i fyra linjer, I-IV, och 13 serotyper, varav linje I och II omfattar de serotyper som orsakar sjukdom hos människa (Lomonaco et al., 2015). *Listeria monocytogenes* är allmänt spridd i naturen och finns därför på många av våra livsmedelsråvaror. Bakterien etablerar sig också lätt som husflora i vissa miljöer, till exempel i lokaler för livsmedelstillverkning, eftersom den har förmåga att bilda biofilm. Det som utmärker listeria är att den kan växa i kylskåpstemperatur, vilket gör att den kan utgöra en fara vid till exempel gravning av fisk. Dessutom tål *Listeria monocytogenes* såväl höga salthalter som lågt pH.

Farokarakterisering

Clostridium botulinum

Bakterier inom arten *Clostridium botulinum* producerar det mest potenta gift som är känt, nervgiftet botulinumtoxin (Ihekwaba et al., 2016). Symptom på förgiftning kan uppkomma mellan ett par timmar upp till flera dagar efter att man har fått i sig giftet, och yttrar sig genom illamående, kräkningar, synrubbningar, tal- och sväljsvårigheter, muskelsvaghet och andningssvårigheter. Denna förgiftning kan ha dödlig utgång om den drabbade inte får omedelbar vård, eftersom det i förlängningen innebär förlamning av andningsmuskulaturen.

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes orsakar två typer av listerios, dels en icke-invasiv variant som vanligtvis inte orsakar några större problem hos annars friska individer, dels en invasiv variant som kan orsaka blodförgiftning och hjärnhinneinflammation (FDA, 2012). Listerios har en hög mortalitet då den ofta drabbar äldre och immunsvaga individer. Infektion med *Listeria monocytogenes* kan också orsaka missfall om den drabbade är gravid.

Exponeringsuppskattning

Sänkning av vattenaktivitet med salt och socker

Vanligt hushållssalt, eller koksalt, består av saltämnet natriumklorid som oftast utvinns ur saltfyndigheter i marken. Salt har ofta flera funktioner i matlagning. Salt är en utmärkt smakförstärkare, men har också en påverkan på livsmedlets textur samt fungerar som ett konserveringsmedel (Doyle and Glass, 2010; Sleator and Hill, 2007). Salt i rätt koncentration hämmar såväl sjukdomsframkallande bakterier som förskämningsorganismer samtidigt som den tillåter tillväxt av mjölksyrabakterier (Doyle and Glass, 2010; Sofos, 1984). Den hämmande effekt som salt har på sjukdomsframkallande bakterier härleds främst till den sänkning av vattenaktivitet som saltet ger (Sofos, 1984). Olika sjukdomsframkallande bakterier kan skilja sig i salttolerans, vilket visas i tabell 1. Tabell 2 visar hur olika koncentrationer av salt påverkar vattenaktiviteten i en vätskelösning.

Mineralsalt är ett samlingsbegrepp på salt där mängden natriumklorid minskats och istället ersatts med andra saltämnen. Den vanligaste ersättaren till natriumklorid är kaliumklorid och till viss del även magnesiumklorid. Proportionerna av de olika saltämnena varierar beroende på märke. Proportionen av natriumklorid och kaliumklorid i några vanliga saltsorter som kan hittas i svenska livsmedelsbutiker visas i tabell 2.

Havssalt är salt som utvinns från havsvatten, och består av en blandning av de saltföreningar som finns i haven. Beroende på hur mycket havssaltet tvättas kan koncentrationen natriumklorid variera, ofta mellan 95-100 procent. Örtsalt är ett samlingsbegrepp på en kryddblandning med högt innehåll av natriumklorid samt med övriga ingredienser såsom exempelvis lök, morot, selleri samt kryddor.

Tabell 2. Proportionerna natriumklorid, kaliumklorid och övriga ingredienser i ett urval av vanligt förekommande saltsorter i svenska livsmedelsbutiker.

| Typ av salt | NaCl (%) | KCl (%) | Övrigt | Referens |
|----------------------------|----------|---------|-----------------------|----------------------|
| Hushållssalt, flera märken | 100 | 0 | 0 | |
| Mineralsalt, Seltin | 50 | 40 | 10% MgCl ₂ | (Cederroth, 2016) |
| Mineralsalt, JOZO | 30 | 69 | 1% övriga mineraler | (JOZO, 2016b) |
| Mineralsalt, Falksalt | 65 | 30 | 5% övriga mineraler | (Falksalt, 2016b) |
| Havssalt, JOZO | 100 | 0 | 0 | (JOZO, 2016a) |
| Havssalt, Falksalt | 99,6 | | 0,4% övriga mineraler | (Falksalt, 2016a) |
| Örtsalt, Kung Markatta | 82,2 | 0 | 17,8% kryddblandning | (KungMarkatta, 2016) |
| Örtsalt, Nordic Spice | 86,5 | 0 | 13,5% kryddblandning | (NordicSpice, 2016) |

I vattenlösningar ger natriumklorid och kaliumklorid upphov till snarlik påverkan på vattenaktiviteten när de tillsätts med avseende på jonstyrka, det vill säga att samma mängd mol tillsätts per liter vatten (Barbut et al., 1986; Bozariis et al., 2007; Lenzi et al., 1975). Kaliumklorid har en högre molmassa än natriumklorid, vilket innebär att det behövs mer gram kaliumklorid för att uppnå samma påverkan på vattenaktivitet som en viss tillsats av natriumklorid. Denna ökning motsvarar ca 30 procent (27,5%) på viktsbasis. I tabell 3 visas den ungefärliga mängd av natriumklorid alternativt kaliumklorid som krävs för att uppnå ett urval av vattenaktiviteter.

Tillsats av socker till livsmedel fungerar, liksom salt, hämmande på förskämning- och sjukdomsframkallande mikroorganismer genom sockrets förmåga att binda vatten. Det krävs dock högre mängd tillsatt socker för att uppnå motsvarande sänkning av vattenaktivitet som för salt, vilket visas i tabell 3.

Tabell 3. Ett urval av vattenaktiviteter och den ungefärliga mängd av natriumklorid (NaCl), kaliumklorid (KCl) eller sackaros som krävs för att uppnå dessa vattenaktiviteter i en vattenlösning (CDC, 1997; Fontana, 2008).

| Vattenaktivitet | NaCl (% w/w) | KCl (% w/w) | Sackaros (% w/w) |
|-----------------|-----------------|----------------|---------------------|
| 0,998 | <0,5 | <0,65 | 17 |
| 0,997 | 0,5 | 0,65 | - |
| 0,994 | 1 | 1,3 | - |
| 0,970 | 5 | 6,5 | 29 |
| 0,955 | 7 | 9 | 38 |
| 0,940 | 9,5 | 12 | 44 |
| 0,930 | 11 | 14 | 50 |

- Mängddata saknas

Sänkning av pH med ättiksyra

Svaga organiska syror, såsom ättiksyra och mjölksyra, är vanliga hämmare av såväl sjukdomsframkallande bakterier som förskämningorganismer i livsmedel (Brul and Coote, 1999). I vattenlösning befinner sig organiska syror i jämvikt mellan dissocierad och icke-dissocierad form, vilket bidrar till deras inhiberande effekt på mikroorganismer (Adams and Moss, 2008; Brul and Coote, 1999). Icke-dissocierade svaga syror kan nämligen passera fritt över cellmembran. Väl inne cellen bryts syran ner vilket skapar ett överskott av protoner som cellen har svårt att utsöndra.

De flesta bakterier har ett pH-optimum på mellan 6-8. Syra-producerande bakterier, såsom mjölksyrabakterier, skiljer sig från övriga bakterier genom att ha ett pH-optimum på mellan 5 och 6 (Adams and Moss, 2008). Den nedre pH-gränsen för tillväxt av bakterier brukar anges ligga ett par pH-enheter under bakteriens optimum. Olika bakterier kan skilja sig i tolerans för låga pH, och minimum för tillväxt för *Clostridium botulinum* och *Listeria monocytogenes* visas i tabell 1.

Ättiksyra är en koncentrerad syra. För livsmedelsbruk finns svagare lösningar av ättika, såsom 12-procentig ättikssprit eller vinäger som kan ha en koncentration på 5-10 procent ättika. Tabell 4 visar effekten av olika koncentrationer av ättika på pH i en vattenlösning.

Tabell 4. Effekt på pH i en vattenlösning efter tillsats av olika mängd ättiksyra (99,8%), ättikssprit (12%) alternativt vinäger (6%).

| Ättiksyra 99,8 % (g/100g) | ättikssprit 12 % (g/100g) | Vinäger 6 % (g/100g) | pH |
|------------------------------|------------------------------|-------------------------|-----|
| 0,25 | 2,1 | 4,2 | 3,1 |
| 0,5 | 4,2 | 8,4 | 2,9 |
| 1 | 8,3 | 16,6 | 2,8 |
| 2 | 16,6 | 33,2 | 2,6 |
| 4 | 33,3 | 66,6 | 2,5 |
| 8 | 66,5 | - | 2,3 |

- Värde saknas

Tillväxthämning av *Clostridium botulinum* sporer och toxin

Proteolytisk *Clostridium botulinum*

Sporer av proteolytisk *Clostridium botulinum* är mycket värmetåligen. Tiden för att reducera sporer av proteolytisk *Clostridium botulinum* 10 gånger ($1 \log_{10}$) brukar anges vara 0,21 minuter vid 121 °C (tabell 1). Vid lägre temperaturer krävs längre tid. Reduktionen av sporer påverkas dessutom av skillnader i värmetålighet mellan olika stammar och egenskapen hos olika livsmedel. Tabell 5 visar de tider som uppmättes i ett försök med värmeavdödning av sex olika botulinum-stammar i tre olika sorters livsmedel. Ur tabell 5 kan det utläsas att det kan ta mellan 5,2 upp till 42,7 minuter att reducera antalet sporer med $1 \log_{10}$ vid 100 °C. Höjs temperaturer till 110 °C sjunker tiderna till mellan 0,9 till 3,3 minuter.

Tabell 5. D-värden, det vill säga tiden för att reducera sporer av proteolytisk *Clostridium botulinum* 10 gånger ($1 \log_{10}$), i tre olika livsmedel vid tre olika temperaturer. Anges i form av lägsta till högsta tid och medelvärde inom parantes. Försöket är utfört på sporer av sex olika botulinum-stammar med varierande värmetålighet, av Bull et al. (2009)

| Livsmedel | D _{100°C} (minuter) | D _{105°C} (minuter) | D _{110°C} (minuter) |
|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Köttfärssås (30% fukthalt) | 5,2-42,4 (13,0) | 1,9-5,8 (3,1) | 0,9-1,4 (1,0) |
| Gräddsås (50% fukthalt) | 9-39,7 (21,3) | 4,2-14 (6,6) | 0,9-3,3 (1,9) |
| Risvattenagar | 12-42,7 (22,0) | 2,2-11,3 (6,2) | 1,2-4,1 (2,2) |

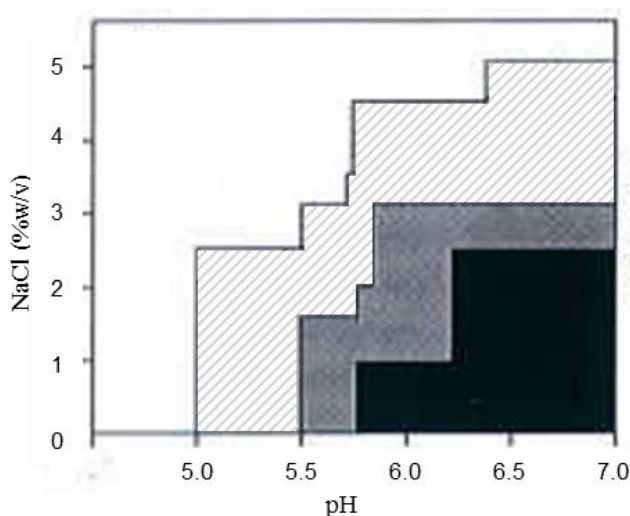
Icke-proteolytisk *Clostridium botulinum*

Gränser för tillväxt av icke-proteolytiska *Clostridium botulinum* som tagits fram genom praktiska försök och modellering illustreras av figur 1 (Graham et al., 1997; Novak et al., 2008). Figuren är kantig eftersom den bygger på försökspunkter. I verkligheten är gränsen antagligen mer jämn.

Figur 1 visar att fem procent natriumklorid och pH 5 är de yttersta gränserna för tillväxt vid 10 °C, vilket visas av den streckade zonerna i figur 1.

Om istället förvaring sker vid 4 °C flyttas de yttersta gränserna för tillväxt till 2,5 procent natriumklorid och pH 5,75, vilket visas av den svarta zonen i figur 1. Detta är dock endast de yttre gränserna för tillväxt av *Clostridium botulinum*. Då både natriumklorid tillsätts och pH sänks behöver inte de yttre nivåerna uppnås. Ju högre koncentration natriumklorid som tillsätts desto mindre behöver pH sänkas, och tvärt om. Exempelvis, i en lösning med 2 procent salt och med ett pH på 6,5 sker, enligt figur 1, tillväxt oavsett om temperaturen är 4, 5 eller 10 °C. Tillsätts lite syra så att pH sänks till 6 kommer tillväxt inte att kunna ske vid 4 °C. Sänks pH ytterligare, till under 5,0 kommer *Clostridium botulinum* inte växa i temperaturer upp till 10 °C.

Detta fenomen, att skapa en aggregerad effekt genom att använda flera tillväxthämmande processer, används ofta i livsmedelskonservering, kallas för "the hurdle effect" (Leistner, 2000). Det är en effekt som fungerar för alla typer av organismer, inte bara *Clostridium botulinum*



Figur 1. Effekt av förvaringstemperatur på tillväxt av icke-proteolytisk *Clostridium botulinum* (typ B, E och F) vid olika pH och natriumklorid (NaCl) koncentrationer. Färgade fält visar att förhållandena stödjer tillväxt vid 4 °C (svart), 5 °C (grå) och 8-10 °C (streckad). Bild anpassad från Novak et al. (2008) med data från Graham et al. (1997).

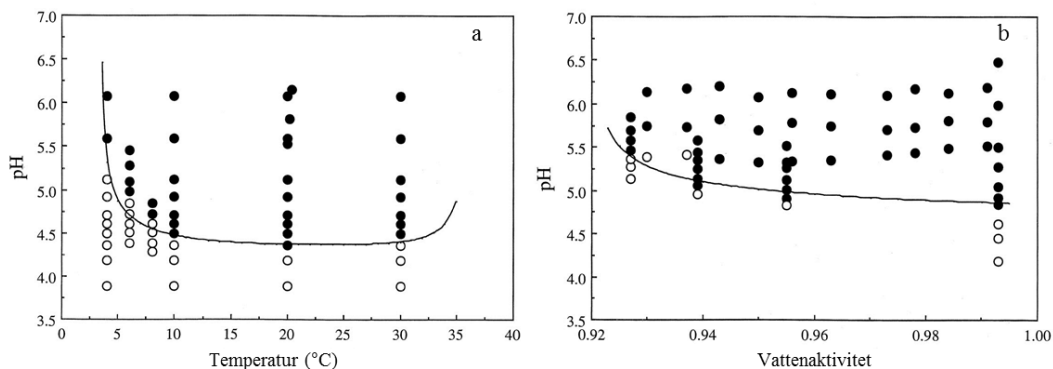
Tillväxt och toxinbildning har studerats i obehandlad regnbågslox som inokulerats med sporer av icke-proteolytisk *Clostridium botulinum* (ca 1 kolonibildande enhet per gram), och sedan vakuumpförpackats och förvarats vid 8 °C i upp till 5 veckor (Hyytiä et al., 1999). Fisken hade ett pH på 6,5 och en vattenaktivitet på 0,985, vilket inte ska innebära någon tillväxthämmande effekt på *Clostridium botulinum*. Genom mus-test påvisades toxinbildning efter 2-3 veckor, då *Clostridium botulinum* ökat 2-3 logenheter. Detta stämmer överens med en annan studie som visat toxinbilning av icke-proteolytisk *Clostridium botulinum* i vakuumpförpackad lax efter 9-15 dagar vid 8 °C (Baker and Genigeorgis, 1990). I denna studie kunde tiden till toxinbildning ökas till 60 dagar genom att sänka temperaturen till 4 °C, medan förvaring i 16 °C minskade tiden till toxinbildning till 3-6 dagar (Baker and Genigeorgis, 1990). Initial sporhalt påverkade inte tiden till toxinbildning (Baker and Genigeorgis, 1990). Det är dock inte helt klarlagt hur toxinbildning regleras hos *Clostridium botulinum* (Ihekweba et al., 2016).

Botulinumtoxin

Botulinumtoxin är värmekänsligt och bryts ner vid upphettning. Vid 85 °C har det visats ta maximalt 5 minuter att totalt reducera botulinumtoxin A, B, E och F (Woodburn et al., 1979). Försöken av Woodburn et al (1979) utgick från en dos på 10^5 LD₅₀ i mustest per gram livsmedel, vilket är en mängd författarna tidigare påvisat i livsmedel.

Tillväxthämning av *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes kan överleva vid höga salthalter såväl som vid lågt pH. Cole et al. (1990) har utfört överlevnads- och tillväxtförsök på *Listeria monocytogenes* vid olika pH-, salt- och temperaturkombinationer. När det gäller tillväxt så visade dessa försök att *Listeria monocytogenes* har förmågan att växa till 100 gånger ($2 \log_{10}$) på 60 dagar vid pH 4,66 i 30 °C. När temperaturen sänktes till 10 °C minskade tillväxtförmågan, då ingen tillväxt skedde under pH 4,83. Sänktes temperaturen ytterligare, till 5 °C skedde tillväxt endast vid pH 7,0. Liknande försök har även utförts av andra. Figur 2 visar under vilka förhållanden *Listeria monocytogenes* kan växa, med avseende på pH och temperatur (figur 2a) samt pH och vattenaktivitet (figur 2b) (Tienungoon et al., 2000). I detta försök växte *Listeria monocytogenes* först vid pH 5,6 i 4 °C, vid pH 5,0 i 6 °C och vid pH 4,7 i 8 °C (figur 2a). På samma vis som för *Clostridium botulinum* ses att tillväxtpotentialen för *Listeria monocytogenes* vid samma pH minskar då vattenaktiviteten sänks. Då vattenaktiviteten är hög (0,993) sker tillväxt vid pH 4,9 medan vid låg vattenaktivitet (0,928) krävs ett pH på 5,4 för att tillväxt ska kunna ske (figur 2b).



Figur 2. Gränser för tillväxt av *Listeria monocytogenes* vid olika pH samt temperatur- alternativt vattenaktivitetsnivåer. (a) Tillväxtförsök vid varierande pH och temperatur har utförts vid en vattenaktivitet på 0,993. (b) Tillväxtförsök vid varierande pH och vattenaktivitet har utförts vid 20 °C. Svart cirkel innebär tillväxt och vit cirkel ingen tillväxt. Svart linje motsvarar en modellerad gräns för tillväxt. Figuren är hämtat från (Tienungoon et al., 2000).

Förekomst av *Clostridium botulinum* i fisk

Det är inte helt enkelt att uppskatta hur vanligt förekommande *Clostridium botulinum* är i sill och lax som finns tillgänglig på den svenska marknaden. Det finns svårigheter med att analysera förekomst av *Clostridium botulinum*, bland annat att detektionsgränsen för analysmetoden måste vara tillräcklig för att kunna fånga upp låga nivåer. De sammanställningar som gjorts har visat på hög förekomst av icke-proteolytisk *Clostridium botulinum* i sediment från skandinaviska vatten (Dodds, 1993). Det har också påvisats att fisk och sediment från skandinaviska vatten, såsom Östersjön och kustnära regioner i västerhavet, ofta innehåller icke-proteolytisk *Clostridium botulinum* (Cann et al., 1965; Dodds, 1993; Hyytiä et al., 1998; Johannsen, 1962). Halterna i fisk minskar dock med ökat avstånd från Östersjön, och förekomsten tycks vara betydligt lägre i fisk från Nordsjön och vattnet runt de Brittiska öarna (Davies et al., 2001; Dodds, 1993).

Inläggning av sill

Inläggning av fisk är en tillrednings- och konserveringsmetod som hämmar sjukdomsframkallande bakterier genom såväl sänkning av vattenaktivitet (genom tillsats av salt och socker) som sänkning av pH (genom tillsats av ättika). Dessutom är inlagd sill en kylvara, och kylskåpstemperatur är därmed ytterligare en tillväxthämmande faktor.

Denna riskvärdering utgår från att fiskråvaran är så kallad inläggningssill, det vill säga saltade och urvattnade sillfiléer som kan köpas i livsmedelsbutiker (Abbas, 2016). Ska färska sillfiléer användas måste de först saltas och sedan urvattnas innan inläggning. Det går också att köpa så kallad 5-minuterssill, som direkt kan smaksättas och ätas direkt utan föregående inläggningssteg.

Principen för inläggning är att inläggningssill tillreds i en lag av ättika och socker. Traditionell inläggningslag är en så kallad 1-2-3-lag, vilket innebär en del syra (12-procentig ättikssprit), två delar socker och tre delar vatten. Efter att inläggningssillen marinerats i inläggningslagen några (1-3) dagar är den färdig att ätas. I detta steg kan den inlagda sillen smaksättas med olika blandningar för att till exempel göra senapsill eller skärgårdssill. En sökning på några vanliga receptsidor på nätet visar att det finns recept som avviker från det traditionella 1-2-3-lagen (ICA, 2016b; Mathem, 2016).

För att få någon form av uppfattning om hur pH och vattenaktivitet påverkas av variationer i inläggningslag, förvaringstid och förvaringstemperatur har ett mindre försök utförts på Livsmedelsverket (Nyberg et al., 2016). I detta försök placerades små bitar av inläggningssill i inläggningslagar med olika proportioner ättika och socker, som sedan lagrades i både 4 och 10 °C under tre veckor. Dag 0 mättes pH och vattenaktivitet på de olika ättikslagarna samt på inläggningssillen. Dag 3 och dag 21 mättes pH och vattenaktivitet på sillfiléer från varje ättikslag- och temperaturkombination. Dag 3 blandades också en röra av crème fraiche, majonnäs, citron, dill och gräslök motsvarande en skärgårdssill. Från ett urval av ättikslagarna fördes några sillfilébitar över till två nya behållare där de blandades med skärgårdsröran. De nya behållarna förvarades på samma vis som sillen i ättikslag vid 4 och 10 °C, och dag 21 mättes pH och vattenaktivitet på även dessa sillar.

I tabell 6 och 7 visas resultaten från Livsmedelsverkets sillinläggningsförsök. Standardrecept på inläggningslag, alltså där 12-procentig ättika, socker och vatten blandas i proportionerna 1-2-3, gav ett pH på 2,8 och en vattenaktivitet på 0,967 (tabell 5). Minskas mängden syra ökar pH, men trots en minskning ner till en fjärdedel förblir pH lägre än 4. Som förväntat ökar vattenaktiviteten när mängden socker halveras.

Tabell 6. Uppmätt pH och vattenaktivitet i egentillverkade sillinläggningslagar med olika proportioner syra (12% ättika) och socker direkt efter tillagning samt efter tre dagar (n=1).

| Egengjord sillinläggningslag | Dag | Syra (%) | Socker (%) | pH | Vattenaktivitet |
|--|-----|----------|------------|-----|-----------------|
| Lag 1. Standardrecept (1-2-3) (100g ättika, 200g socker, 300 g vatten) | 0 | 2 | 33 | 2,8 | 0,967 |
| | 3 | | | 3,8 | 0,951 |
| Lag 2. Halverad mängd syra (0,5-2-3) (50g ättika, 200g socker, 300g vatten) | 0 | 1 | 33 | 3,0 | 0,970 |
| | 3 | | | 3,8 | 0,952 |
| Lag 3. En fjärdedels mängd syra (0,25-2-3) (25g ättika, 200g socker, 300g vatten) | 0 | 0,5 | 33 | 3,3 | 0,969 |
| | 3 | | | 3,8 | - |
| Lag 4. Halverad mängd socker (1-1-3) (100g ättika, 100g socker, 300g vatten) | 0 | 2 | 16,5 | 2,9 | 0,98 |
| | 3 | | | 3,8 | - |
| - Mätvärde saknas | | | | | |

Tabell 7. Effekt av olika proportioner syra (12% ättika), socker och vatten i inläggningslagar på pH och vattenaktivitet i sillfiléer som legat i de olika lagarna i 0, 30 och 21 dagar.

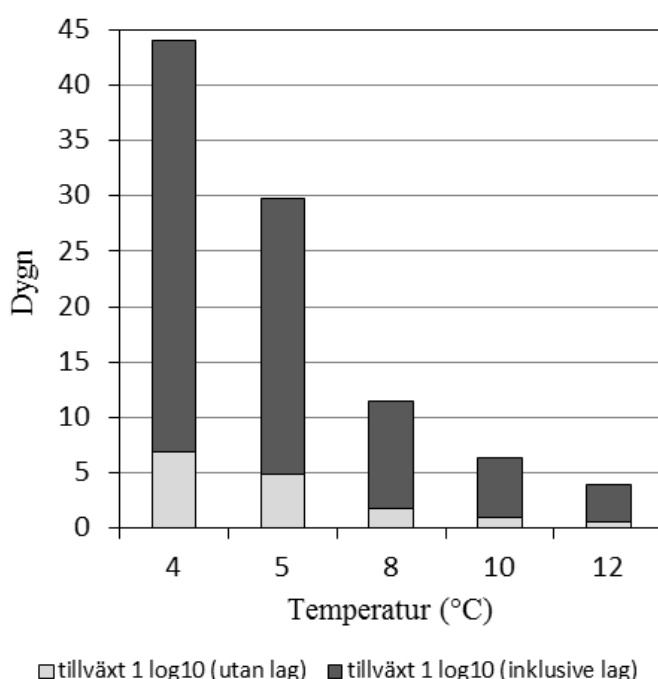
| Sillfiléer | Dag | pH 4 °C | Vattenaktivitet 4 °C | pH 10 °C | Vattenaktivitet 10 °C |
|--|----------------|---------|----------------------|----------|-----------------------|
| Referens: | 0 | 4,5 | 0,932 | 4,5 | 0,932 |
| Ätfärdig klassisk inlagd sill | 3 | 4,2 | 0,930 | 4,3 | 0,932 |
| | 21 | 4,2 | 0,939 | 4,3 | 0,971 |
| Sill i lag standardrecept (1-2-3) (100g ättika, 200g socker, 300g vatten) | 0 ^a | 5,5 | 0,922 | 5,5 | 0,922 |
| | 3 | 4,4 | 0,934 | 4,3 | 0,939 |
| | 21 | 4,0 | 0,943 | 3,7 | 0,955 |
| - i skärgårdssås | 21 | 4,2 | 0,960 | 4,1 | 0,980 |
| Sill i lag med 1/2 syra (0,5-2-3) (50g ättika, 200g socker, 300g vatten) | 0 ^a | 5,5 | 0,922 | 5,5 | 0,922 |
| | 3 | 4,6 | 0,944 | 4,5 | 0,946 |
| | 21 | 4,1 | 0,953 | 3,9 | 0,971 |
| - i skärgårdssås | 21 | 4,2 | 0,964 | 4,0 | 0,979 |
| Sill i lag med 1/4 syra (0,25-2-3) (25g ättika, 200g socker, 300g vatten) | 0 ^a | 5,5 | 0,922 | 5,5 | 0,922 |
| | 3 | 4,8 | 0,943 | 4,8 | 0,947 |
| | 21 | 4,6 | 0,954 | 4,4 | 0,976 |
| - i skärgårdssås ^b | 21 | - | - | - | - |
| Sill i lag med 1/2 socker (1-1-3) (100g ättika, 100g socker, 300g vatten) | 0 ^a | 5,5 | 0,922 | 5,5 | 0,922 |
| | 3 | 4,0 | 0,958 | 4,0 | 0,954 |
| | 21 | 3,8 | 0,960 | 3,8 | 0,979 |
| - i skärgårdssås | 21 | 3,9 | 0,943 | 3,8 | 0,976 |

^a Mätningar gjorda på sillen innan placering i de olika lagarna och i 4 alternativt 10 °C.

^b Inget försök gjordes med skärgårdssås för sill i lag med 1/4 syra.

Produkten inläggningssill har, hos en vanligt förekommande producent, en salthalt på 6,4 procent (Abbas, 2016). Livsmedelsverkets egna försök visade att sådan inläggningssill hade ett pH på 5,5 och en vattenaktivitet på 0,922 (tabell 7). Lagringsförsöket visade att inläggningssillens pH sjönk över tid då de flyttats över till inläggningslag (tabell 7). Vattenaktiviteten ökade dock över tid, och mer vid 10 °C jämfört med vid 4 °C (tabell 7). Den högsta vattenaktiviteten som uppmättes under de tre veckor försöket pågick var 0,980, vilket motsvarar en teoretisk tillsats på 3,5 procent natriumklorid.

Figur 3 visar den potentiella tillväxt som skulle kunna ske i osaltad och osyrad sill vid olika kyltemperaturer. Detta genom att använda tillväxtdata från Combase för *Clostridium botulinum* vid pH 6,5 och vattenaktivitet 0,985. Det som figur 3 tydligt illustrerar är att lagfasen har stor påverkan på den totala tillväxttiden, framför allt vid de lägre temperaturerna.



Figur 3. Beräknat antal dygn för 10 gångers ($1 \log_{10}$) anaerob tillväxt av icke-proteolytisk *Clostridium botulinum*, med och utan lagfas inkluderad, i osaltade och osyrade sillfiléer med pH 6,5 och vattenaktivitet 0,985.

Gravning av lax

Gravning av fisk är en tillredning- och konserveringsmetod som hämmar sjukdomsframkallande bakterier genom sänkning av vattenaktivitet genom tillsats av salt och socker. I Sverige är det traditionellt främst lax som gravas, men det går också att grava andra fiskar och kött. Gravad lax är dessutom en kylvara, vilket innebär att ytterligare en bakteriehämmande barriär tillämpas genom förvaring vid låg temperatur. Rå fisk gnids in med salt, socker och eventuella smaksättare varefter fisken får ligga kallt i ett eller flera dygn.

En granskning av de vanligaste recept på gravad fisk (lax) som går att finna genom en sökning av receptsidor på nätet visar att det förekommer variationer i angivna proportioner av salt och

socker (tabell 8). Vid traditionell gravning brukar lika mängder salt och socker användas (Coop, 2016; ICA, 2016a; Tasteline, 2016). Men det finns också recept som avviker från det traditionella, som till exempel anger dubbla mängden socker i förhållande till salt (Allt_om_mat, 2016; Arla, 2016).

I tabell 8 redovisas två olika gravningsrecept och vad de innebär i mängd tillsatt natriumklorid respektive kaliumklorid vid användning av fyra olika sorters salt. De salter som används i tabell 8 är traditionellt hushållssalt, Seltin, JOZO mineral och Falksalt med mindre mängd natrium (tabell 2).

Tabell 8. Två olika recept på gravad lax med olika proportioner socker och salt och de mängder socker, NaCl och KCl de olika recepten medför om vanligt hushållssalt alternativt tre olika mineralsalt skulle användas.

| Recept | Saltsort | Socker (/kg fisk) | Socker (% w/w) | Salt (/kg fisk) | NaCl (% w/w) | KCl (% w/w) |
|----------------------|--------------|-------------------|----------------|-----------------|--------------|-------------|
| socker: salt (1:1) | Hushållssalt | 4 msk 60 g | 6 | 4 msk 68 g | 6,8 | 0 |
| socker: salt (1:1) | Seltin | 4 msk 60 g | 6 | 4 msk 68 g | 3,4 | 2,7 |
| socker: salt (1:1) | JOZO mineral | 4 msk 60 g | 6 | 4 msk 68 g | 2,0 | 4,7 |
| socker: salt (1:1) | Falksalt | 4 msk 60 g | 6 | 4 msk 68 g | 4,4 | 2,0 |
| socker: salt (1:0,5) | Hushållssalt | 4 msk 60 g | 6 | 2 msk 34 g | 3,4 | 0 |
| socker: salt (1:0,5) | Seltin | 4 msk 60 g | 6 | 2 msk 34 g | 1,7 | 1,4 |
| socker: salt (1:0,5) | JOZO mineral | 4 msk 60 g | 6 | 2 msk 34 g | 1,0 | 2,3 |
| socker: salt (1:0,5) | Falksalt | 4 msk 60 g | 6 | 2 msk 34 g | 2,2 | 1,0 |

Det finns inte många studier där effekten av alternativa salters tillväxthämmande effekt studerats och jämförts med effekten av natriumklorid. Majoriteten av de som finns är utförda på köttprodukter eller i odlingsmedium (Barbut et al., 1986; Emodi and Lechowich, 1969; Gimeno et al., 2001). Den enda som har hittats där effekten av kaliumklorid studerats på *Clostridium botulinum* i fisk är Pelroy et al. (1985), som undersökt inhibering av sporer av icke-proteolytisk *Clostridium botulinum* i marinerad torsk. Denna studie visade på likvärdig inhiberande effekt när de två salterna tillsats i samma mängd avseende jonstyrka (mol/g). Den maximala mängd (vikt) salt som tillät sporulering var 2,7 procent natriumklorid per fiskvikt, 3,5 procent kaliumklorid per fiskvikt samt 3,5 procent av en 50/50 blandning, avseende mol, av de två salterna.

När det gäller *Listeria monocytogenes* finns två studier där effekten av alternativa salters tillväxthämmande effekt studerats (Bozariis et al., 2007; Zarei et al., 2012). Zarei et al. (2012) visade att *Listeria monocytogenes* var mer tolerant mot höga koncentrationer (11 procent) kaliumklorid jämfört med samma koncentration räknat på viktprocent natriumklorid. Bozariis et al. (2007) studerade hämning av *Listeria monocytogenes* vid tillsats av samma koncentration av de två salterna räknat på molvikt och påvisade då en likvärdig hämning. Skillnaden mellan dessa två studier är att salttillsatserna av Bozariis et al. (2007) gett upphov till liknande påverkan på vattenaktivitet. I försöket av Zarei et al. (2012), som räknat på viktprocent, gav tillsatsen av natriumklorid upphov till en lägre vattenaktivitet än tillsatsen av kaliumklorid. Detta kan förklara att Zarei et al. (2012) såg en sämre tillväxthämning av kaliumklorid på *Listeria monocytogenes*. Att natriumklorid och kaliumklorid hämmar tillväxt av bakterier på likartat vis när de tillsätts avseende molvikt har också visats i studier av *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter sakazakii*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus* samt 3 stammar av *Staphylococcus aureus* (Beuchat, 1974; Bidlas and Lambert, 2008; Jakobsen et al., 1972).

Hemsyrning av grönsaker

Syrning, alternativt fermentering eller mjölksyrarjäsning, av grönsaker är en konserveringsmetod som utnyttjar naturligt förekommande mjölksyrabakteriers (eller mjölksyrabakterier från en startkulturs) förmåga att i frånvaro av syre omvandla kolhydrater från grönsaker till mjölksyra (Adams and Moss, 2008; Caplice and Fitzgerald, 1999).

Syrning går att utföra på de flesta grönsaker. En vanlig produkt är vitkål som syras till surkål. Grönsakerna skivas eller strimlas och saltas. Saltet drar ut vätska ur grönsakerna och skapar en miljö som gynnar tillväxt av mjölksyrabakterier samtidigt som förskämningensorganismer hämmas (Adams and Moss, 2008; Nylander et al., 2014). Saltet påverkar också smaken och konsistensen på den syrade produkten (Eldrimner, 2013). Hur mycket salt som bör användas varierar beroende på typ av grönsak som syras, och enligt olika källor anges intervall mellan 0,5-3 procent (Adams and Moss, 2008; Eldrimner, 2013). För lite salt gör att andra mikroorganismer, såsom förskämningensorganismer och sjukdomsframkallande organismer kan växa till, att syrningsprocessen inte kommer igång eller att syrningsprocessen fördröjs (Adams and Moss, 2008; USDA, 2015; Viander et al., 2003). Dessutom ger för lite salt försämrad konsistens på grönsakerna eftersom det hindrar pektinnedbrytande enzymer att bryta ner grönsakernas cellväggar. Grönsakerna packas tätt i glasburkar så att luftfickor försvinner och grönsakerna täcks av sin vätska (Eldrimner, 2013). Luftfickor bör undvikas för att förskämningensbakterier inte ska kunna växa till. Burkarna försluts och får stå i några veckor tills färdig produkt uppnåtts. Ett tecken på en fungerande process är att vätskan bubblar och att det bildas gas i glasburken under de första dagarna.

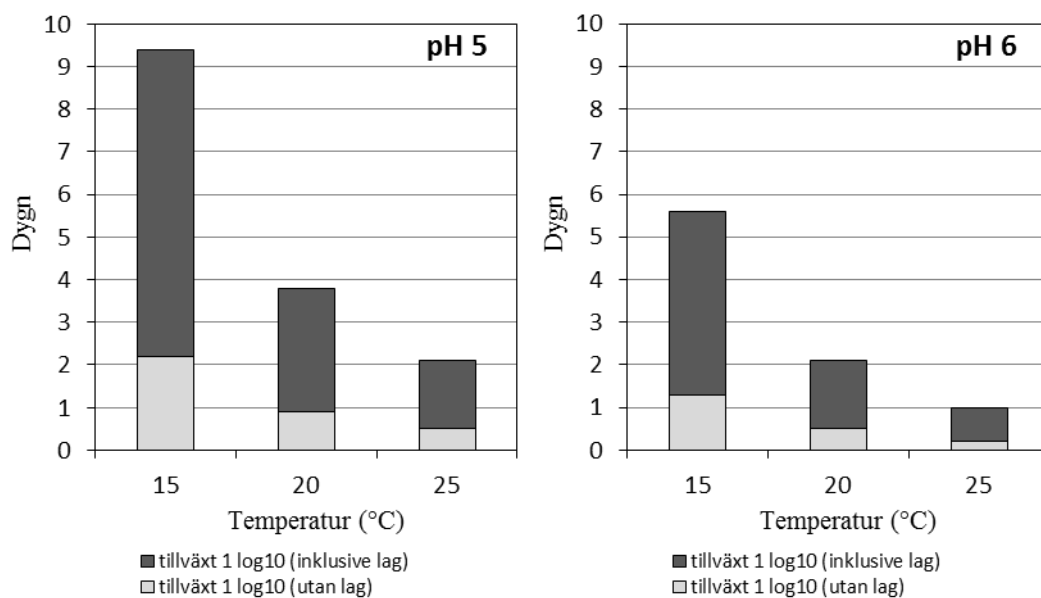
En rad olika mjölksyrabakterier är inblandade i syrningsprocessen (Adams and Moss, 2008). Till en början är det salttoleranta stammar som växer snabbast, och dessa producerar koldioxid och ättiksyra. Detta medför att pH sjunker samt hjälper till att skapa anaeroba förhållanden (Adams and Moss, 2008). Efter att syrahalten ökat tar mer syratoleranta mjölksyrabakterier vid, och det börjar produceras mer mjölksyra. De organiska syrorna och andra bakteriehämmande metaboliter skapar en miljö som gynnar mjölksyrabakterier och förhindrar tillväxt av andra mikroorganismer (Caplice and Fitzgerald, 1999). Den främsta inhiberande effekten vid syring av grönsaker är den sänkning av pH som produktionen av mjölksyra och ättiksyra ger upphov till (Adams and Moss, 2008). Vid en fungerande process sjunker pH snabbt och bör ligga nära

pH 4 efter de första två dagarna (Adams and Moss, 2008). Då har mjölksyrabakterier gått från att ha varit cirka 1 procent av förekommande bakterier till mer än 90 procent (Adams and Moss, 2008). I den färdiga produkten ligger pH vanligtvis mellan 3,5-4,0 (Adams and Moss, 2008).

Värmekonservering av grönsaker och svamp

Värmekonservering eller hermetisk inkokning är en metod som ger en mycket lång hållbarhet på livsmedel om den utförs på rätt sätt. De flesta typer av livsmedel går att värmekonservera, och man bör använda sig av speciella glasburkar med tillhörande lock och gummipackning. Glasburken fylls till cirka tre fjärdedelar med det livsmedel som ska kokas in, sedan täcks livsmedlet med vatten och lite salt kan tillsättas för smakens skull. Sedan läggs locken på och en bygelklämman som håller locket på plats. Glasburkarna placeras sedan i en tryckkokare, konserveringsautomat, eller i vattenbad i ugn, och får koka under en viss tid. Efter kokning får burkarna svalna, klämman tas bort och locken skruvas åt hårt.

Om konserveringen misslyckas, och sporer av *Clostridium botulinum* finns kvar i konservern medför den anaeroba miljön som skapats att tillväxt och toxinbildning kan ske, vilket illustreras av figur 4. Grönsaker och svamp är inte tillräckligt sura för att i sig själva hämma tillväxt av proteolytisk *Clostridium botulinum*, vilken är fallet för frukt och bär. De flesta grönsaker har ett pH-värde mellan 5-6, och svamp har ett pH-värde på cirka 6,5 (USDA, 2015), vilket är nivåer som stödjer tillväxt av proteolytisk *Clostridium botulinum*. Figur 4 visar beräknad tid för tillväxt av 1 log-enhet proteolytisk *Clostridium botulinum* i livsmedel med pH 5 (exempelvis squash, morot) samt pH 6 (exempelvis lök, ärtor) utifrån tillväxtmodeller i ComBase. Tomat är en grönsak som befinner sig på gränsen för att tillåta tillväxt av *Clostridium botulinum*, med pH-värden som ligger mellan 4-4,5. Enligt US Department of Agriculture bör därför även tomat behandlas som övriga grönsaker (USDA, 2015).



Figur 4. Tid för anaerob tillväxt av 10 gångers ökning ($1 \log_{10}$) proteolytisk *Clostridium botulinum* vid pH 5 samt pH 6, med och utan lagfas.

Riskkaraktärisering

Fråga om fiskinläggningar

Rådet att enbart följa beprövade sillinläggningsrecept baseras på gammal hävd, praktisk erfarenhet och avsaknad av kunskap om var den nedre gränsen för koncentrationen ättiksyra, salt och socker går för att sporer av *Clostridium botulinum* inte ska gro och tillväxa.

- a) Vilka andra relevanta biologiska hälsofaror än *Clostridium botulinum* kan förekomma i klassisk inlagd sill?
- b) Utgå från färdig inläggningssill och ta fram vilka olika koncentrationer av ättiksyra och socker som sammantaget förhindrar att botulinum-sporer gro och tillväxer i den färdiga inlagda sillfilén. Ta hänsyn till hur salt och socker påverkar vattenaktiviteten och till att sillfilén i sig kan påverka pH i hela inläggningen. Redovisa gärna svaret i diagramform och omvandla ättiksyran till ättikssprit (12 %).
 - i Eftersom kylskåpstemperaturer varierar mellan hushåll, ange tillväxtmöjligheterna för de olika pH-vattenaktivitetskombinationerna vid 5, 8, 10 och 12 °C.
 - ii Hur påverkas tillväxtmöjligheten av andra surgörare som till exempel sherryvinäger?
- c) Färdig inlagd sill bör förvaras kylskåpskallt. Hur länge kan hemgjord inlagd sill kylförvaras vid olika kyltemperaturer och ändå betraktas som säker med avseende på *Clostridium botulinum*? Gör, om möjligt, tillväxtberäkningar för temperaturerna (4), 5, 6, 8, 10 och 12 °C samt variera pH-värde och vattenaktivitet motsvarande de tre sill-sorterna:
 - i Klassisk inlagd sill i klar ättikslag
 - ii Senapssill
 - iii Majonnäs och gräddfil/crème fraiche-baserad sill (t. ex. skärgårdssill)

Svar om fiskinläggningar

- a) Hög salthalt, lågt pH-värde och förvaring i kylskåpstemperatur är tre faktorer som effektivt avdödar alternativt hämmar tillväxt av sjukdomsframkallande mikroorganismer i klassisk inlagd sill. Så länge lagen täcker sillen och de eventuella smaksättare som tillsats och sillen förvaras i kylskåp kan klassisk inlagd sill anses vara en mikrobiologiskt säker produkt.
- b) För att undvika tillväxt av eventuellt förekommande sporer av icke-proteolytisk *Clostridium botulinum* krävs att sillen har antingen minst 5 procents salthalt eller ett pH-värde på 5 eller lägre. Råvaran inläggningssill har en salthalt på drygt 6 procent, vilket gör att den redan från början är säker med avseende på *Clostridium botulinum*.

Det saknas information om pH-värden och vattenaktivitet på inläggningslagar och inlagd sill i den vetenskapliga litteraturen. Därför utfördes ett mindre försök vid Livsmedelsverket under våren 2016. Detta försök visade att en hemgjord klassisk inläggningslag gjord på ättika, socker och vatten i förhållande 1-2-3 får ett pH-värde som ligger under 3 och en vattenaktivitet på cirka 0,970. Efter tre dagars inläggning i klassisk lag hade sillfiléerna ett pH-värde på 4,0-4,4 och en vattenaktivitet på 0,930-0,947, vilka är värden som inte tillåter tillväxt av *Clostridium botulinum*. När mängden syra, i form av 12-procentig ättika, i inläggningslagen minskades till en fjärdedel höjdes pH-nivån till strax under 5 och när mängden socker minskades till hälften höjdes även vattenaktiviteten till 0,954-0,958. Inte heller dessa värden tillåter tillväxt av *Clostridium botulinum*.

Även om detta försök skulle behöva upprepas innan allt för långtgående slutsatser dras, tyder det på att det går att sänka mängden syra alternativt socker i inläggningslag och fortfarande på en säker produkt med avseende på *Clostridium botulinum*.

- c) Det finns inga data att tillgå i litteraturen som visar på hur pH och vattenaktivitet i sillfiléer förändras i sillen över tid. Teoretiskt kan det antas att det över tid kommer ske en jämvikt mellan sillfilé och lag. Resultat från Livsmedelsverkets studie stöder denna hypotes. Alla sillfiléer, som placerats i lagar med lägre pH än vad sillen hade, visade ett lägre pH vid dag 21 jämfört med dag 3. Det omvända skedde med vattenaktiviteten, som ökade då sillen antagligen drog åt sig vatten från lagen över tid.

Om inläggningssill lagras i en lag som har lägre vattenaktivitet, till exempel om mindre socker än traditionellt rekommenderas använts, kommer vattenaktiviteten i sillen att höjas. För att säkerställa att sillen är säker med avseende på *Clostridium botulinum* bör då mängden tillsatt ättiksyra vara sådan att det ger ett tillräckligt lågt pH-värde för att förhindra tillväxt av *Clostridium botulinum*. Om inläggningssill lagras i en lag som har såväl högre pH som högre vattenaktivitet jämfört med en klassisk ättikslag, till exempel en skärgårdsröra eller senapssill, är det viktigt att förvara sillen i kyla.

Temperaturen som den inlagda sillen förvaras i är nämligen också en viktig faktor när det gäller hållbarheten. Vid gynnsamma förhållanden har tillväxtberäkningar visat att det i obehandlad sill kan ta *Clostridium botulinum* drygt 40 dygn att öka tiofalt ($1 \log_{10}$) vid 4 °C, strax över 10 dygn vid 5 °C och mindre än 5 dygn vid 12 °C.

Fråga om typ av salt vid gravning av fisk

Koncentrationen natriumklorid är lägre i mineralsalt (t.ex. seltin och havssalt) än i vanligt salt.

- Hur påverkas den mikrobiologiska säkerheten och kvaliteten om man använder mineralsalt istället för natriumklorid till att grava fisk? Beakta de bakteriella farorna *Listeria monocytogenes* och *Clostridium botulinum* samt förskämningssorganismer som exempelvis relevanta arter av mjölktyrabakterier.
- Går det att kompensera för den lägre koncentrationen natriumklorid i mineralsalt genom att öka mängden utan att påverka den mikrobiologiska säkerheten?

Svar om typ av salt vid gravning av fisk

- a) Mineralsalt är ett samlingsbegrepp på salt där mängden natriumklorid minskats och istället ersatts med andra saltämnen. Den vanligaste ersättaren till natriumklorid är kaliumklorid. Det finns olika märken av mineralsalt på marknaden, och mängden natriumklorid som ersatts med kaliumklorid varierar mellan dessa. Mängden tillsatt natriumklorid kommer således variera beroende på vilket märke av mineralsalt som används. Dessutom har en snabb genomgång av olika gravningsrecept visat att mängden salt och socker i förhållande till fisk även varierar mellan olika recept, vilket också påverkar mängden tillsatt natriumklorid.

Den bakteriehämmande effekt som salt har i livsmedel härleds främst till den sänkning av vattenaktivitet som saltet ger. För icke-proteolytisk *Clostridium botulinum*, vilket är den typ som är vanligast i fisk, krävs en tillsats på 5 procent natriumklorid för att förhindra tillväxt. *Listeria monocytogenes* är mer salttolerant, och kräver upp till 12 procent natriumklorid för tillväxthämning. Dessa mängder natriumklorid motsvarar en vattenaktivitet på 0,97 för *Clostridium botulinum* och 0,92 för *Listeria monocytogenes*. I vattenlösningar ger natriumklorid och kaliumklorid upphov till snarlik påverkan på vattenaktiviteten när de tillsätts med avseende på molvikt. Det behövs ca 30 procent (27,5%) mer kaliumklorid, på viktsbasis, än natriumklorid för att uppnå samma påverkan på vattenaktivitet.

Även om det skulle behöva bekräftas av fler studier pekar de som finns på att natriumklorid och kaliumklorid ger upphov till likvärdig hämning av bakterier, inklusive *Clostridium botulinum* och *Listeria monocytogenes*, då de tillsätts i sådan mängd att samma sänkning av vattenaktivitet uppnåts. Det finns dock flertalet studier som pekar på att kaliumklorid påverkar smaken på livsmedlet negativt jämfört med natriumklorid.

- b) Om man använder ett mineralsalt som innehåller 50 procent natriumklorid behöver man dubbla mängden för att få samma mängd natriumklorid som om vanligt hushållssalt hade använts. Men om man tar hänsyn till att kaliumklorid också sänker vattenaktiviteten, men att det krävs 30 procent mer för att nå samma nivå som för natriumklorid, behöver man bara tillsätta 15 procent mer mineralsalt om den innehåller 50-50 procent natriumklorid respektive kaliumklorid. En ökad mängd salt påverkar inte den mikrobiologiska säkerheten negativt.

Fråga om värmekonservering och hemsyrning

Hur förhindrar man att botulinum-sporer gro och sen förökar sig i färdiga produkter:

- Hemsyrade grönsaker, till exempel surkål och rotsaker.
- Hemkonservering av grönsaker, till exempel tomat, paprika, squash eller lök.
- Hemkonserverad svamp.

Svar om värmekonservering och hemsyrning

- a) När det gäller hemsyrning är det viktigt att följa beprövade recept och metodik, då dessa är utvecklade för att gynna tillväxten av mjölksyrabakterier. En effektiv fermenteringsprocess medför att pH sjunker kraftigt de första två dagarna, för att sedan stabiliseras någonstans mellan 3,5-4,0. Ett tecken på en fungerande process är att vätskan bubblar och att det bildas gas i behållaren under de första dagarna. När pH sjunkit under 4,5 är förhållandena sådana att sporer av proteolytisk *Clostridium botulinum* inte kan växa eller bilda toxin. Detta skulle kunna testas om man har pH-stickor tillgängliga.
- b) Om viabla sporer av *Clostridium botulinum* finns kvar efter hemkonservering medför förhållandena i konserven att de snabbt kan tillväxa och bilda toxin. För att säkerställa att sporer av proteolytisk *Clostridium botulinum* avdödas vid hemkonservering krävs höga temperaturer eftersom grönsaker inte är tillräckligt sura för att underlätta inhiberingen.

För hemkonservering i kastrull eller i vattenbad i ugn krävs långa koktider för att garantera en säker produkt. Det är dock svårt att säga hur lång koktiden bör vara. Det finns försök som visat att det kan ta allt ifrån 5 upp till 43 minuter för att minska antalet sporer 10 gånger vid 100 °C, beroende på skillnad i stamspecifik värmetålighet och typ av livsmedel. Tyvärr saknas data på hur höga koncentrationer av *Clostridium botulinum* som kan finnas i livsmedel, men man bör säkerställa att koktiden ger en högre reduktion än endast en 10 gånger.

För att komma upp i temperaturer som garanterat tar död på sporer bör en tryckkokare användas. Det är den säkraste metoden för hemkonservering av livsmedel med lågt syrainnehåll, såsom kött, fisk och grönsaker inklusive svamp, är genom användning av tryckkokare. Det är också den metod som rekommenderas av US Department of Agriculture för hemkonservering av livsmedel som inte innehåller syra, såsom (USDA, 2015).

I den färdiga konserven är den enda kontrollåtgärd som finns för att förhindra tillväxt av proteolytisk *Clostridium botulinum* att förvara konserven svalt, vid en temperatur under 10-12 °C (Peck, 2010). En annan säkerhetsåtgärd är att hetta upp innehållet i konserven före konsumtion då botulinumtoxin inaktiveras av värme. Vid 85 °C tar det cirka 5 minuter att totalt reducera botulinumtoxin

- c) För hemkonservering av svamp gäller samma som för övriga grönsaker.

Referenser

- Abbas, 2016. Abbas inläggningssill. <https://abba.se/produkter/sill/abba-inlaggningssill-urvattnad/>. 2016-12-01.
- Adams, M., Moss, M., 2008. Food microbiology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Allt_om_mat, 2016. Allt om mat gravad lax. <http://alltommat.se/recept/gravad-lax-3/>. 2016-11-29.
- Arla, 2016. Arla gravad lax. <http://www.arla.se/recept/gravad-lax/>. 2016-11-29.
- Baker, D., Genigeorgis, C., 1990. Predicting the safe storage of fresh fish under modified atmospheres with respect to *Clostridium botulinum* toxigenesis by modeling length of the lag phase of growth. *Journal of Food Protection*. 53, 131-140.
- Barbut, S., Tanaka, N., Maurer, A. J., 1986. Effects of varying levels of chloride salts on *Clostridium Botulinum* toxin production in turkey frankfurters. *Journal of Food Science*. 51, 1129-1131.
- Beuchat, L. R., 1974. Combined effects of water activity, solute, and temperature on the growth of *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied Microbiology*. 27, 1075-1080.
- Bidlas, E., Lambert, R. J. W., 2008. Comparing the antimicrobial effectiveness of NaCl and KCl with a view to salt/sodium replacement. *International Journal of Food Microbiology*. 124, 98-102.
- Boziaris, I. S., Skandamis, P. N., Anastasiadi, M., Nychas, G. J. E., 2007. Effect of NaCl and KCl on fate and growth/no growth interfaces of *Listeria monocytogenes* Scott A at different pH and nisin concentrations. *Journal of Applied Microbiology*. 102, 796-805.
- Brul, S., Coote, P., 1999. Preservative agents in foods - Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*. 50, 1-17.
- Bull, M. K., Olivier, S. A., van Diepenbeek, R. J., Kormelink, F., Chapman, B., 2009. Synergistic inactivation of spores of proteolytic *Clostridium botulinum* strains by high pressure and heat is strain and product dependent. *Applied and Environmental Microbiology*. 75, 434-445.
- Cann, D., Wilson, B., Hobbs, G., Shewan, J., A, J., 1965. The incidence of *Clostridium botulinum* type E in fish and bottom deposits in the North Sea and off the coast of Scandinavia. *Journal of Applied Bacteriology*. 28, 426-430.
- Caplice, E., Fitzgerald, G. F., 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 50, 131-149.
- CDC, 1997. Water activity of sucrose and NaCl solutions. *Food Safety Bulletin*. 3.
- Cederroth, 2016. Seltin. <http://www.cederroth.se/sv/Varumarken/Halsal/Seltin1/>. 2016-11-29.
- Cole, M. B., Jones, M. V., Holyoak, C., 1990. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*. 69, 63-72.
- Collins, East, 1998. Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. *Journal of Applied Microbiology*. 84, 5-17.
- Coop, 2016. Coop gravad lax. <https://www.coop.se/recept--mat/recept/g/gravad-lax/>. 2016-11-29.
- Davies, A. R., Capell, C., Jehanno, D., Nychas, G. J. E., Kirby, R. M., 2001. Incidence of foodborne pathogens on European fish. *Food Control*. 12, 67-71.
- Dodds, K., *Clostridium botulinum* in the environment. In: A. Hauschild, K. L. Dodds, Eds.), *Clostridium botulinum: Ecology and control in foods*. Marcel Dekker, New York, 1993.
- Doyle, M. E., Glass, K. A., 2010. Sodium Reduction and Its Effect on Food Safety, Food Quality, and Human Health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9, 44-56.
- EFSA, 2010. Scientific opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA Journal*. 8, 1543-.
- Eldrimner, 2013. Förädling av bär, frukt och grönsaker - en handbok i mathantverk.
- Emodi, A. S., Lechowich, R. V., 1969. Low temperature growth of type E *Clostridium botulinum* spores. 2. Effects of solutes and incubation temperature. *Journal of Food Science*. 34, 82-87.
- Falksalt, 2016a. Falksalt Medelhavssalt. <http://www.falksalt.com/sv/produkter/medelhavssalt/finkornigt-medelhavssalt.html>. 2016-11-29.

- Falksalt, 2016b. Hushållssalt med naturligt mindre natrium. <http://www.falksalt.com/sv/produkter/produkter-med-jod/hushallssalt-med-naturligt-mindre-natrium.html>. 2016-11-29.
- FDA, Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins, Second Edition. 2012.
- Feldhusen, F., 2000. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection*. 2, 1651-1660.
- Fontana, A. J., Appendix B: Water activity of unsaturated salt solutions at 25°C. *Water Activity in Foods*. Blackwell Publishing Ltd, 2008, pp. 395-397.
- Gimeno, O., Astiasarán, I., Bello, J., 2001. Influence of partial replacement of NaCl with KCl and CaCl₂ on microbiological evolution of dry fermented sausages. *Food Microbiology*. 18, 329-334.
- Graham, A. F., Mason, D. R., Maxwell, F. J., Peck, M. W., 1997. Effect of pH and NaCl on growth from spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum* at chill temperature. *Letters in Applied Microbiology*. 24, 95-100.
- Hyytiä, E., Hielm, S., Korkeala, H., 1998. Prevalence of *Clostridium botulinum* type E in Finnish fish and fishery products. *Epidemiology and Infection*. 120, 245-250.
- Hyytiä, E., Hielm, S., Morkkila, M., Kinnunen, A., Korkeala, H., 1999. Predicted and observed growth and toxigenesis by *Clostridium botulinum* type E in vacuum-packaged fishery product challenge tests. *International Journal of Food Microbiology*. 47, 161-169.
- ICA, 2016a. ICA gravad lax. <http://www.ica.se/recept/gravad-lax-2562/>. 2016-11-29.
- ICA, 2016b. ICA inlagd sill. <http://www.ica.se/recept/inlagd-sill-grundrecept-389491/>. 2016-11-29.
- Ihekweba, A. E. C., Mura, I., Malakar, P. K., Walshaw, J., Peck, M. W., Barker, G. C., 2016. New elements to consider when modeling the hazards associated with botulinum neurotoxin in food. *Journal of Bacteriology*. 198, 204-211.
- Jakobsen, M., Filtenborg, O., Bramsnaes, F., 1972. Germination and out-growth of the bacterial spore in the presence of different solutes. *Lebensm. Wiss. Technol.* 5, 159.
- Johannsen, A., 1962. *Clostridium botulinum* in Sweden and the adjacent waters. *Journal of Applied Bacteriology*. 26, 43-47.
- JOZO, 2016a. JOZO Havssalt. <http://www.dabas.com/ProductSheet/Details.ashx/17524>. 2016-11-29.
- JOZO, 2016b. JOZO Mineralsalt. <http://www.dabas.com/ProductSheet/Details.ashx/17524>. 2016-11-29.
- KungMarkatta, 2016. Kung Markatta örtsalt. <http://www.dabas.com/ProductSheet/Details.ashx/150062>. 2016-11-29.
- Leistner, L., 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*. 55, 181-186.
- Lenzi, F., Tran, T.-T., Teng, T.-T., 1975. The Water-activity of supersaturated aqueous solutions of NaCl, KCl, and K₂SO₄ at 25°C. *Canadian Journal of Chemistry*. 53, 3133-3140.
- Lindström, M., Kiviniemi, K., Korkeala, H., 2006. Hazard and control of group II (non-proteolytic) *Clostridium botulinum* in modern food processing. *International Journal of Food Microbiology*. 108, 92-104.
- Lomonaco, S., Nucera, D., Filipello, V., 2015. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infect Genet Evol.* 35, 172-183.
- Mathem, 2016. Mathem inlagd sill. <https://www.mathem.se/recept/inlagd-sill>. 2016-11-29.
- Mizan, M. F. R., Jahid, I. K., Ha, S.-D., 2015. Microbial biofilms in seafood: A food-hygiene challenge. *Food Microbiology*. 49, 41-55.
- NordicSpice, 2016. Nordic Spice örtsalt. <http://www.dabas.com/ProductSheet/Details.ashx/164273>. 2016-11-29.
- Novak, J., Peck, M., Juneja, V., Johnson, E., *Clostridium botulinum* and *Clostridium perfringens*. In: P. Fratamico, A. Bhunia, J. Smith, (Eds.), *Foodborne pathogens* Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2008.
- Novotny, L., Dvorska, L., Lorencova, A., Beran, V., Pavlik, I., 2004. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. *Veterinary Medicine (Prague)*. 49, 343-358.
- Nyberg, K., Egervärn, M., Gidlund, A., 2016. Sillinläggningsförsök. Livsmedelsverket.
- Nylander, A., Jonsson, L., Marklinder, I., Nydahl, M., 2014. *Livsmedelsvetenskap*. Studentlitteratur, Lund, Sverige.
- Peck, M. W., 2006. *Clostridium botulinum* and the safety of minimally heated, chilled foods: an emerging issue? *Journal of Applied Microbiology*. 101, 556-570.

- Peck, M. W., *Clostridium botulinum*. In: V. Juneja, J. Sofos, Eds.), Pathogens and toxins in foods: Challenges and interventions. ASM Press, Washington, DC, 2010.
- Pelroy, G. A., Scherer, A., Peterson, M. E., Paranjpye, R., Eklund, M. W., 1985. Inhibition of Clostridium botulinum Type E Toxin Formation by Potassium Chloride and Sodium Chloride in Hot-Process (Smoked) Whitefish (*Coregonus clupeaformis*). Journal of Food Protection. 48, 971-975.
- Sleator, R. D., Hill, C., 2007. Food reformulations for improved health: A potential risk for microbial food safety? Medical Hypotheses. 69, 1323-1324.
- Sofos, J. N., 1984. Antimicrobial effects of sodium and other ions in foods: a review. Journal of Food Safety. 6, 45-78.
- Tasteline, 2016. Tasteline gravad lax. <http://www.tasteline.com/recept/gravad-lax-3/>. 2016-11-29.
- Tienungoon, S., Ratkowsky, D. A., McMeekin, T. A., Ross, T., 2000. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and Lactic Acid. Applied and Environmental Microbiology. 66, 4979-4987.
- USDA, 2015. Compled guide to home canning. Agricultural Information Bulletin. 539.
- Viander, B., Mäki, M., Palva, A., 2003. Impact of low salt concentration, salt quality on natural large-scale sauerkraut fermentation. Food Microbiology. 20, 391-395.
- Woodburn, M. J., Somers, E., Rodriguez, J., Schantz, E. J., 1979. Heat inactivation rates of botulinum toxins A, B, E, and F in some foods and buffers. Journal of Food Science. 44, 1658-1661.
- Zarei, M., Pourmahdi Borujeni, M., Khezzadeh, M., 2012. Comparing the effect of NaCl and KCl on the growth of *Listeria monocytogenes* with a view to NaCl replacement. Iranian Journal of Veterinary Research. 13, 147-151.



Livsmedelsverket

Uppsala Hamnesplanaden 5, SE-751 26

www.livsmedelsverket.se