



SPISS

Naturfaglige artikler av
elever i videregående
opplæring

Er konserveringsmidlene benzosyre og sorbinsyre skadelig for tarmbakterier?

Forfattere: Linnéa Maria Skille, Iselin Langås Sunde og Andrea Kristine Eide Øfstaas, Ullern videregående skole

Tidligere forskning viser til at mennesker er helt avhengige av bakteriene i tarmfloraen. I dette forsøket ble Escherichia coli K-12 eksponert for konserveringsmidlene benzosyre og sorbinsyre for å undersøke overlevelsesraten. Etter at sorbinsyre og benzosyre ble tilsatt på petriskåler med E. coli, ble det observert en redusert vekst av E. coli, og bakteriene ble i stor grad drept.

Introduksjon

I løpet av de siste tiår har man funnet ut at mennesker er helt avhengige av å sameksistere med bakteriene i og på kroppen, og at balanse i tarmfloraen er viktig for helsen og for immunforsvaret. Både tarmsykdommer og andre sykdommer som diabetes, allergier, hjertesykdom, Parkinson og Alzheimer kan ha en sammenheng med ubalanse og lavere diversitet i tarmfloraen (Bøhn, 2019).

Bakterier ble opprinnelig oppdaget ved at de var en årsak til sykdom. Allerede på 1800-tallet fant man ut at smittsomme sykdommer var forårsaket av bakterier (Bøhn, 2019). Innen medisinsk forskning har man vært mest opptatt av bakterienes negative konsekvenser. Det har blitt utviklet metoder for å kontrollere bakterievekst i omgivelsene våre og i maten vi spiser. Tilsetningsstoffer har lenge blitt tilsatt i mat for å kontrollere bakterievekst, bevare kvaliteten på matvarer, forlenge holdbarheten, fremheve smak, gi en bestemt konsistens, farge eller for å erstatte sukker.

Konserveringsmidler er en type tilsetningsstoffer som blir tilsatt i mat for å forlenge holdbarheten. Dette gjør at man kaster mindre mat og forhindrer matsvinn. Blant konserveringsmidlene som blir mest brukt i Norge, er benzosyre (E 210) og sorbinsyre (E 200) de vanligste (Egeland, 2021). Benzosyre (E 210) brukes som en antibakteriell hemmer, og forhindrer vekst av gjær og muggsopp i syreholdige matvarer som syltetøy, majoneser og saft (Matoppskrift.no). Sorbinsyre (E 200) hindrer gjæring og sopp, og har også en hemmende effekt hos enkelte bakterier som; *Staphylococcus aureus* og *Salmonella* (Sofos, John N., 1994). Sorbinsyre tillater bakteriell vekst og modning i for eksempel meieriprodukter. Både benzosyre og sorbinsyre finnes naturlig i mange bær, men lages ofte syntetisk. Dyrestudier har ikke gitt tydelige resultater på

at sorbinsyre skaper problemer ved tester utført med store doser av syren over lengre tidsperioder (Shibamoto & Bjeldanes, 2009). Benzosyre var derimot assosiert med misdannelse hos hamstere og redusert foropptak og redusert vekst (International Journal of Toxicology, 2001). Studiene testet toksisiteten på dyr og ikke effekten syrene har på tarmbakterier, men viser at konserveringsmidlene har en effekt på dyr, og er derfor relevant for vårt forsøk.

Det anbefalte daglige inntak for benzosyre er fastsatt til 5 mg/kg, og 25 mg/kg for sorbinsyre av Verdens helseorganisasjon. (World Health Organization, 2005) (Wood & Key, 2004) Restriksjonene som er satt på disse konserveringsmidlene ble satt på grunnlag av toksisiteten syrene har på mennesker, og ble satt før man kunne bekrefte at tarmbakterier spiller en viktig rolle for den generelle helsen. *Escherichia Coli* er en vanlig tarmbakterie som utgjør en viktig del av normalfloraen i tykktarmen hos mennesker. *E. coli* er også nyttig for fordøyelsen og produserer K-vitamin som er nødvendig for at blodet skal koagulere (Sirevåg, 2019). *E.coli* opprettholder levedyktighet ved svært lav pH gjennom flere forskjellige toleransemekanismer (Warnecke & Gill, 2005). Denne konkurransefordelen til *E.coli* hindrer sykdomsfremkallende bakterier fra å få fotfeste og formere seg i tarmfloraen. Overlevelsen av *E.coli* når den utsettes for konserveringsmidler vil derfor være nyttig å undersøke fordi bakterien har flere viktige funksjoner i kroppen og effekten av konserveringsmidler på tarmbakterier er lite undersøkt.

Konserveringsmidler blir brukt i de fleste matprodukter. Dersom konserveringsmidler kan skade eller drepe tarmbakterier ved samme konsentrasjon som blir brukt i dagens matproduksjon, bør man redusere bruken av konserveringsmidler. I dette forskningsprosjektet skal det derfor undersøkes om konserveringsmidlene sorbinsyre (E 200) og benzosyre (E 210) dreper *E.coli* ved konsentrasjonene: 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 6 µg/ml, 8µg/ml og 10 µg/ml *in vitro*, altså utenfor organismen. Nullhypotesen i dette prosjektet er: Konserveringsmidlene sorbinsyre (E 200) og benzosyre (E 210) dreper ikke *E.coli* bakterier og den alternative hypotesen er da: Benzosyre (E 210) og sorbinsyre (E 200) dreper *E.coli* bakterier.

Metode

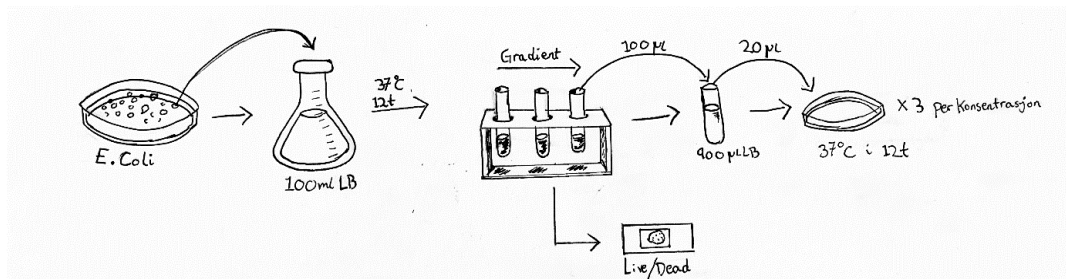
I dette prosjektet skulle det undersøkes overlevelsen av *Escherichia coli* K-12 dersom bakteriene ble utsatt for konserveringsmidlene sorbinsyre (E 200) og benzosyre (E 210) i tilsvarende konsentrasjoner som brukes i mat. Fordi sorbinsyre og benzosyre er de vanligste konserveringsmidlene i Norge (Egeland, 2021), har vi valgt disse syrene. Det ble brukt Sorbic Acid, 99 % (A16196.30) og Benzoic Acid, 99 % (A14062.30) fra Thermo Scientific™.

Til å begynne med ble en koloni med *E.Coli* bakterier dyrket i en kolbe med 100 ml LB-medium. Denne kolben ble satt i varmeskap på 37°C over natten. Det var disse bakteriene som ble brukt i forsøket. Tidligere undersøkelser med lyspektrometer viste at Log-phase var omtrent etter 10 timer.

For å finne ut av hvilke konsentrasjoner bakteriene skulle utsettes for, ble det først gjennomført et pilotforsøk for å se hvilke konsentrasjoner som ville gi en tydelig hemmende effekt på bakterievekst. Det ble brukt *E.coli* bakterier i forsøket fordi det er lett å dyrke, i motsetning til tarmflora som er utfordrende å dyrke og vanskelig å utføre forsøk på. *E.coli* er en modellorganisme som i dette prosjektet representerer tarmfloraen til mennesker. Konsentrasjonene vi valgte til pilot forsøket var basert på de normale mengdene av sorbinsyre og benzosyre som brukes i matprodukter i dag.

Videre ble det laget en bakterie-stockløsning. Denne bestod av 9,9 mL LB-medium og 100 µl bakterier av en kultur som var blitt dyrket opp fra en koloni over natt til ca. log-fase. 1 mL av bakterie-stockløsningen ble tilsatt til hver av konsentrasjonene: 0 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 200 µg/ml, 500 µg/ml og 100 µg/ml av benzosyre og sorbinsyre. Før stockløsningene med bakterier ble fortynnet, fikk de stå i 30 minutter for at benzosyre og sorbinsyre skulle få tid til å virke på bakteriene. LB-mediet brukt til agar-skålene ble også

tilsatt syrene, og hadde lik konsentrasjonsgradient som bakteriene ble inkubert i. Dette ble gjort for at bakteriene kontinuerlig skulle utsettes for syrene mens de vokste. Etter 30 minutter ble 100 μ l av hver løsning fortynnet i 900 μ l LB-medium. 20 μ l av fortynningen ble overført til agar-skåler, og fikk stå i varmeskap over natten. Se figur 1 for oversikt over metoden.



Figur 1: Oversikt over forsøk med sorbinsyre og benzoesyre på *E.coli*

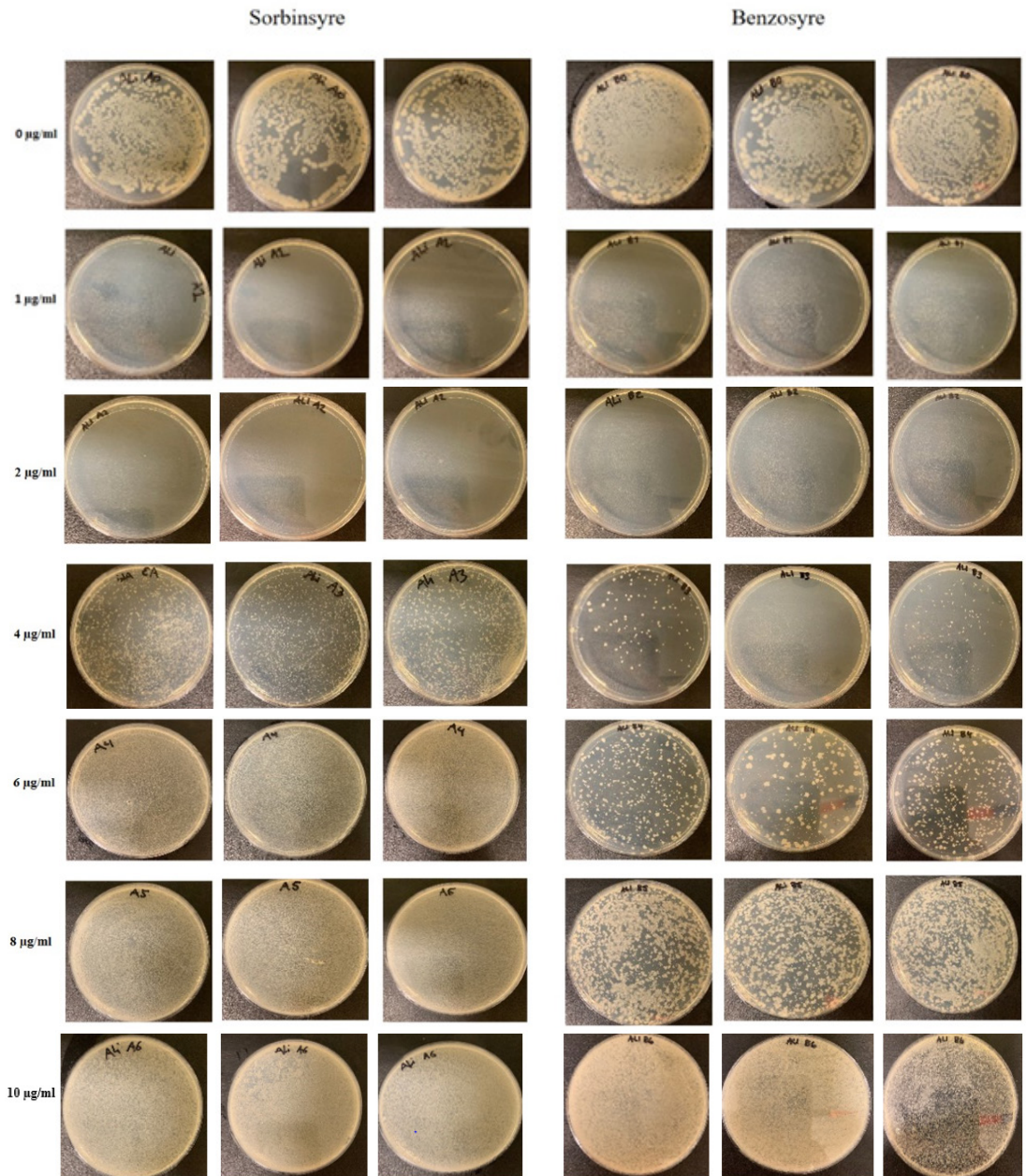
Siden ingen av bakteriene overlevde i pilotforsøket, ble konsentrasjonene fortynnet til 1/10. Konsentrasjonsgradienten i hovedforsøket ble som følgende; 0 μ g/ml, 1 μ g/ml, 2 μ g/ml, 4 μ g/ml, 6 μ g/ml, 8 μ g/ml og 10 μ g/ml.

Hovedforsøk

Sorbinsyre og benzoesyre ble målt opp i 6 mengder til de ulike konsentrasjonene: 0.02 mg, 0.04 mg, 0.08 mg, 0.12 mg, 0.16 mg og 0.20 mg. Konsentrasjonene var like for begge syrene, og det ble målt opp nok til 3 paralleller. De ulike løsningene ble videre plassert i hver sin erlenmeyerkolbe før 60 ml vann ble tilsatt. Syrene løste seg ikke opp av seg selv og ble derfor kokt på en kokeplate med magnetisk spinner til syrene var fullstendig løst opp. Til slutt ble løsningene fordelt på 3 petriskåler per konsentrasjon med 20 ml løsning i hver. Det ble også laget kontroller til begge syrene for å utelukke at bakteriene døde av andre årsaker.

Resultater

Bildene i figur 2 viser at konsentrasjonene 1 μ g/ml, 2 μ g/ml, 4 μ g/ml, 6 μ g/ml, 8 μ g/ml og 10 μ g/ml av benzoesyre og sorbinsyre forhindrer *E.coli* fra å lage store bakteriekulturer, og dreper i stor grad bakteriene. Antall drepte bakterier øker ved bruk av høyere konsentrasjoner, men også de laveste konsentrasjonene har en høy dødelighet hos bakteriene. Dette gjelder for både benzoesyre og sorbinsyre.



Figur 2: Resultatet av sorbinsyre og benzosyre på agarplater med E.Coli.

Ved høyere konsentrasjoner ser det ut som det er mye bakterievekst, dette er fordi syrene ikke løste seg fullstendig opp. Prikkene på bildene er uoppløst syre, og ikke bakteriekolonier.

Diskusjon

Formålet med denne studien var å undersøke om sorbinsyre og benzosyre dreper *E. coli* ved konsentrasjoner basert på de vi finner i matprodukter. Det viser seg at begge syrene var svært effektive til å forhindre vekst av *E. coli*, og mange av bakteriene døde. Ut ifra figur 2 kan vi se at alle skålene som hadde tilsatt benzosyre og sorbinsyre hadde svært få eller ingen bakterier. Dette er likevel vanskelig å se ut ifra bildene, ettersom de høyere konsentrasjonene av benzosyre og sorbinsyre ikke løste seg opp fullstendig, og kan ligne på bakteriekulturer. Fra pilotforsøket visste vi at benzosyre er et skadelig konserveringsmiddel i store konsentrasjoner, og at det ville gi tydelige resultater i form av antall drepte bakterier. Dette bekreftet pilotforsøket vårt ved at benzosyre i stor grad skadet eller hemmet vekst på agarplatene hvor syren var tilsatt. Det som var overaskende, var at de fleste bakteriene som ble utsatt for sorbinsyre også døde eller fikk hemmet vekst. Sorbinsyre er et mildere konserveringsmiddel enn benzosyre, og det er derfor lovlig å bruke større mengder av syren i matprodukter. Resultatene våre viser at sorbinsyre er mer skadelig enn vi hadde forventet, og kan indikere at sorbinsyre har samme skadelige effekt på *E.coli* som benzosyre. Derfor burde man vurdere å også begrense bruken av sorbinsyre i matprodukter.

Forsøket vårt omfatter hvordan syrene påvirker *E.coli in vitro*, og vil derfor ikke være helt representativt for effekten syrene vil ha på *E.coli* i tarmen. Konserveringsmidler blir brutt ned i magesyren i tillegg til at det fortynnes av væske i kroppen. Resultatene våre viste at både sorbinsyre og benzosyre dreper *E.coli* utenfor kroppen og dersom det viser seg at syrene reduserer vekst av *E.coli* i tarmen, *in vivo*, kan konserveringsmidlene langsiktig ha en skadelig effekt for helsen. Det er viktig å ha moderate mengder *E.coli* i tarmen for å blant annet utkonkurrere sykdomsfremkallende bakterier. For fremtidige forsøk vil det derfor være bedre egnet å bruke enda lavere og mer fortynnede konsentrasjoner av syrene. Dette vil gi et bedre bilde på hvordan konserveringsmidler påvirker *E.coli in vivo*.

Det er viktig å belyse enkelte feilkilder som kan ha påvirket forsøket. Unøyaktighet i volum spredd på agarplatene kan ha påvirket resultatene. Den mest synlige feilkilden er at det er vanskelig å se resultatene på agarskålene fordi de høyere konsentrasjonene ikke løste seg fullstendig opp. Dette er spesielt betydelig da det kan være vanskelig å se forskjell på hva som er bakterier og hva som er klumper med syre. Videre kan det ha vært noe unøyaktighet i konsentrasjonene da vekten vi brukte manglet lokk og massen derfor ble påvirket av luft i rommet. Samtidig gjorde dette også at vi ikke hadde mulighet til å forske på lavere konsentrasjoner, noe som kunne vært interessant å se på ut ifra de resultatene vi fikk. Noe som kan ha påvirket veksten til bakteriene er at de ikke var i nøyaktig Log-phase. *E.Coli* bakteriene kom i Log-phase etter omtrent 10 timer, men ble stående noe lengre da vi måtte ha dem i varmeskap over natten.

Konklusjon

Konserveringsmidler og deres langsiktige effekt på helsen er et lite belyst tema som det ikke er gjort mye forskning på. Resultatene fra denne studien viser at benzosyre og sorbinsyre er skadelig for *E.coli*, som har en viktig funksjon i menneskets tarmflora. Vi får daglig i oss ulike konserveringsmidler fra diverse produkter, men hvor stort det daglige inntaket er for en gjennomsnittlig person er usikkert. Hypotesen vår om at benzosyre (E 210) og sorbinsyre (E 200) dreper *E.coli* stemmer. Resultatene viser at konserveringsmidlene dreper og forhindrer vekst av *E.coli*. Dersom konserveringsmidler dreper *E.coli* og eventuelt andre bakterier i tarmfloraen, vil dette kunne være skadelig for helsen. Dette er et fagområde som burde forskes mer på for å forsikre at ens generelle helse ikke blir negativt påvirket av store mengder konserveringsmidler.

Annerkjennelse

Takk til Termofisher Scientific for økonomisk støtte til forsøket.

Referanser

- Bøhn, S. (2019, november 21). *Sammenheng mellom tarmflora og helse*. Hentet januar 28, 2022 fra <https://bramat.no/eksperter/ekspertblogg/3294-sammenheng-mellom-tarmflora-og-helse>
- Chipley, J. R. (2005). Sodium Benzoate and Benzoic Acid. I P. M. Davidson, J. N. Sofos, & A. L. Branen, *Antimicrobials in Food* (ss. 11-38). CRC Press. Hentet fra https://books.google.no/books?hl=no&lr=&id=OU9sBgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA11&dq=benzoic+acid+bacteria&ots=hl9TNWb8hJ&sig=phNJIF78b_c3IttygjDvmplo70&redir_esc=y#v=onepage&q=benzoic%20acid%20bacteria&f=false
- Egeland, E. S. (2021, Juli 26). *konserveringsmidler i mat*. Hentet November 19, 2021 fra SNL.no: https://snl.no/konserveringsmidler_i_mat
- EØS. (2016, November 11). KOMMISJONSFORORDNING (EU) nr. 1129/2011. *EØS-tillegget til Den europeiske unions tidende*. Hentet fra <https://lovdata.no/static/NLX3/32011r1129.pdf>
- International Journal of Toxicology. (2001, januar 01). *Final report on the safety assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid, and Sodium Benzoate*. Hentet januar 30, 2022 fra europemc.org: <https://europemc.org/article/med/11766131>
- Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., & Gould, G. W. (2000). The Effect of Benzoic and Sorbic Acids on Growth. I *Microbiological Safety and Quality of Food* (s. 185). Gaithersburg, Maryland: Aspen Publisher, INC.
- Matoppskrift.no. (u.d.). Hentet januar 13, 2022 fra Informasjon om benzosyre: https://www.matoppskrift.no/sider/stoff_side.asp?id=Benzosyre
- Mattilsynet. (2019, Desember 2). *Tilsetningsstoffer*. Hentet November 19, 2021 fra mattilsynet.no: https://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/tilsatte_stoffer/tilsetningsstoffer/
- Shibamoto, t., & Bjeldanes, L. F. (2009). *Introduction to Food Toxicology*. London: Elsevier: Academic Press.
- Sirevåg, R. (2019, August 9). *E. coli*. Hentet Januar 4, 2022 fra Store Norske Leksikon: https://sml.snl.no/E._coli
- Sofos, John N. (1994). Antimicrobial Agents. I J. A. Maga, *Food Additive Toxicology* (s. 504). Colorado, USA: Marcel Dekker.
- Warnecke, T., & Gill, R. (2005, august 25). *Microbialcellfactories.biomedcentral.com*. Hentet januar 25, 2022 fra <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-4-25>
- Wood, R., & Key, P. (2004). Use of food preservatives and additives in meat and their detection techniques. *Analytic Methods for Food Additives*.
- World Health Organization. (2005). Concise International Chemical Assessment Document 26: BENZOIC ACID AND SODIUM BENZOATE., (ss. 10-18). Geneva.