

# Konservering af naturmaling

Julie Just Munch, Mette Nielsen og Lone Buhl, Erhvervsakademi Sjælland, Danmark

## Resume

Fire konserveringsmidler (natriumbenzoat, kaliumsorbat, natriumpropionat og methylparaben) blev testet for deres evne til at hæmme mikrobiel vækst.

Konserveringsmidlerne blev testet hver for sig ved forskellige pH-niveauer og MIC-værdier blev beregnet. Udvalgte konserveringsmidler blev testet i kombination og effekten vurderet efter beregning af FIC-indekset.

Effekten af natriumbenzoat, kaliumsorbat og natriumpropionat afhang af pH i mediet og hæmmede væksten af *Pseudomonas* og *Cladosporium* bedst ved pH 4. Kun methylparaben var uafhængig af pH-niveauet og kunne som det eneste af konserveringsmidlerne hæmme væksten af *Micrococcus* og *Aspergillus*. Kombinationen af natriumbenzoat og kaliumsorbat i koncentrationerne 4000ppm/1000ppm havde en synergistisk effekt på alle testede mikroorganismer ved pH 4.

Naturmaling blev brugt til udvikling af en metode til direkte detektion af mikrobiel vækst i maling. Ved tilsætning af TTC kunne bakterievækst observeres som rødfarvning af malingen. Farveintensiteten afhang af koncentrationen af malingen og inokulationsmængden af bakterierne. Indledende test af methylparabens effekt på bakteriel vækst i maling viste, at 2000 ppm var den laveste koncentration af methylparaben, der kunne hæmme væksten af *Pseudomonas*.

*Nøgleord:* Naturmaling, konserveringsmiddel, MI, MIC, FIC, TTC

## Introduktion

Nogle producenter af naturmaling har problemer med mikrobiel vækst i malingen. Ved naturmaling skal i denne sammenhæng forstås vandbaseret olieemulsionsmaling, der ikke indeholder konserveringsmidlet

methylisothiazolinon (MI) eller andre isothiazolinon-forbindelser.

Isothiazolinoner er kendt for at kunne migrere til luften i de malede lokaler og føre til allergiske reaktioner som voldsomme udslæt på huden, øjensvie og lignende.

Til forebyggelse af mikrobiel vækst i malingen, er det derfor interessant at finde konserveringsmidler, der ikke migrerer og forårsager skade på

personer. I dette projekt er det blevet undersøgt om standard-konserveringsmidler, der normalt anvendes i fødevarerindustrien, kan bruges til at forhindre mikrobiel vækst i naturmaling. Derudover er der udviklet en metode, som kan bruges til at konstatere mikrobiel vækst i ikke-transparente produkter som maling.

Natriumbenzoat (E211), kaliumsorbat (E202) og natriumpropionat (E281 er alle hyppigt anvendte fødevarer-godkendte konserveringsmidler og blev derfor udvalgt til test. Konserveringsmidlernes effekt er pH-afhængig<sup>1</sup>, idet stofferne primært er funktionelle som udissocierede syrer.

<sup>1</sup> Bøgh-Sørensen, Leif; Zeuten, Peter (2009): *Konserveringsteknik 2*, 1. udg., København. DSR forlag

Virkningsoptimum ligger derfor under konserveringsmidlernes pKa-værdi (natriumbenzoat, pKa 4,2; kaliumsorbat, pKa 4,8; natriumpropionat, pKa 4,9). Konserveringsmidlerne kan have en mere begrænset effekt ved pH-værdier over pKa afhængig af konserveringsmidlernes dissociationskonstant<sup>2</sup>. Methylparaben (E218) blev brugt som reference (positiv konserveringskontrol), men er uønsket i naturmaling, da parabener generelt har et dårligt ry og står på EU's liste over potentielt hormonforstyrrende stoffer<sup>3</sup>. Pseudomonas aeruginosa, Micrococcus luteus, Aspergillus niger og Cladosporium ssp. er fire hyppigt forekommende og meget forskellige stammer. De blev derfor brugt som mikrobielle testorganismer i dette projekt. M9GY og potato dextrose broth (PDB) fungerede som næringsmedier for hhv. bakterierne og svampene og har tidligere været brugt til test af mikrobiociders virkning<sup>4</sup>. Mikrobiel vækst måles spektrofotometrisk som OD (optisk densitet) ved 590 nm før og efter inkubation. Når kulturens OD<sub>590</sub> er ca. 0,1 før inkubation, vil differencen i OD før og efter inkubation angive væksten. MIC (minimal inhibitory concentration) er den laveste koncentration af konserveringsmidlerne, der hæmmer væksten. MIC<sub>95</sub>, hvor væksten er hæmmet >95%, kan findes ud fra beregnet % inhibition i brøndene. Til analyse af konserveringsmidlers synergistiske effekt på mikroorganismer er FIC-test (fractional inhibitory concentration) med det beregnede FIC-

indeks en meget anvendt metode. FIC angiver den laveste koncentration af kombinationen af konserveringsmidler, der hæmmer væksten af en given mikroorganisme. FIC-indekset angiver, om konserveringsmidlerne virker synergistisk, additivt, indifferent eller antagonistisk.

*Beregning af FIC (Fractional Inhibitory Concentration)-index:*  
 $\Sigma FIC = FIC \text{ for konserveringsmiddel A} + FIC \text{ for konserveringsmiddel B}$

*FIC for konserveringsmiddel A = (MIC for konserveringsmiddel A i kombination)/(MIC for konserveringsmiddel A alene)*

*FIC for konserveringsmiddel B = (MIC for konserveringsmiddel B i kombination)/(MIC for konserveringsmiddel B alene)*

- Synergistisk effekt defineres som  $\Sigma FIC \leq 0,5$
- Additiv effekt defineres som  $0,5 < \Sigma FIC \leq 1$
- Indifference defineres som  $1 < \Sigma FIC \leq 4$
- Antagonisme defineres som  $\Sigma FIC > 4$

Litteraturen<sup>5</sup> beskriver metoder til påvisning af forurening i maling, hvor den forurenede maling podes direkte på f.eks. TSA (trypton soya agar) eller podes på TSA efter opformering i TSB (trypton soya broth). Kolonidannelse på pladerne angiver, om malingen har været forurenset. Disse metoder viser ikke, om de tilstedeværende mikroorganismer kan opformeres i malingen. Desuden kan det være et problem, at direkte podet maling størkner under inkubationen af

<sup>2</sup> Ibid

<sup>3</sup> <http://mst.dk/kemi/kemikalier/fokus-paa-saerlige-stoffer/hormonforstyrrende-stoffer/identifikation-af-hormonforstyrrende-stoffer/kategori-1-paa-eus-liste-over-potentielt-hormonforstyrrende-stoffer/>

<sup>4</sup> Carlsen, Anders; Tiedtke, Gerhard: New solutions for in-can preservation in the making for Europe. I: [info.sword-achiever.com](http://info.sword-achiever.com) (2011)

<sup>5</sup> ASTM international, D2574 – 06 (Reapproved 2012): Standard Test Method for Resistance of Emulsion Paints in the Container to Attack by Microorganisms

agarpladerne og herved forhindrer den mikrobielle vækst.

Mange bakterier kan reducere det farveløse TTC (tetrazoliumchlorid) til det røde farvestof formazan<sup>6</sup>. Vi testede derfor, om man ved hjælp af TTC kunne bestemme bakterievæksten direkte i malingen.

### Materialer og metoder

De anvendte konserveringsmidler var Natriumbenzoat (Fluka), Kaliumsorbat (Sigma-Aldrich), Natriumpropionat (Sigma) og Methylparaben (Riedel de Haën). Mikroorganismene *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Aspergillus niger* og *Cladosporium* (egne stammer). De anvendte bouilloner var Potatodextrose Broth (Fluka), M9GY bestående af M9 med 0,2 % glucose (Merck) og 0,1 % gærekstrakt (Merck). De to bouilloner blev hver især delt i tre portioner og pH blev justeret til hhv. 4, 5 og 7.

Til test af konserveringsmidlernes effekt over for de udvalgte mikroorganismer ved forskellige pH-værdier blev der lavet to stamopløsninger af hvert af konserveringsmidlerne natriumbenzoat, kaliumsorbat og natriumpropionat på 16.000 ppm. Fortyndingsmidlerne var hhv. PDB og M9GY. Stamopløsningerne blev efterfølgende sterilfiltreret. De to bakterier blev dyrket overnight i TSB og herefter fortyndet i M9GY, og svampene blev dyrket på MEA og fortyndet i PDB - alle til en OD<sub>590</sub> på 0,2. Ved opsætningen af mikrotiterplader (se fig. 1 i bilag) blev der anvendt de tre forskellige pH-værdier, de fire forskellige mikroorganismer ved en slut-OD<sub>590</sub> svarende til 0,1 og slut-koncentration på konserveringsmidlerne på 8000 ppm til

125 ppm i to-foldsfortyndinger. Der blev lavet fire-dobbelt bestemmelse. Til fortynding af svampe blev anvendt PDB. Til fortynding af bakterierne blev anvendt M9GY. Inkubation blev foretaget ved hhv. 25°C (svampe) og 30 °C (bakterier). For alle mikroorganismers vedkommende blev OD<sub>590</sub> målt før inkubation og efter 1 og 4 døgn.

Til test af konserveringsmidlernes effekt i kombination blev fortyndingerne udført på samme måde (se figur 2 i bilag), dog blev der kun testet natriumbenzoat og kaliumpropionat og stamopløsningerne var på 64.000 ppm. De to konserveringsmidler blev krydset i koncentrationerne 16.000 ppm til 125 ppm i to-foldsfortyndinger. Desuden anvendtes methylparaben alene i koncentrationerne 8000 ppm til 125 ppm. OD<sub>590</sub> blev målt før inkubation og efter 1 og 4 døgn for alle mikroorganismer.

Til udvikling af testmetode for vækst i maling anvendtes autoklaveret maling, der først var fortyndet med 1 del ionbyttet vand. Som indikator for vækst anvendtes TTC (Fluka) i en slutkoncentration på 0,01 %. I mikrotiterbakken (se figur 3 i bilag) blev malingen fortyndet i tofoldsfortyndinger i koncentrationer fra 1/4 til 1/4096. De to bakterier samt *Cladosporium* blev fortyndet, så de før påsætning havde en OD<sub>590</sub>=0,2. I brøndene blev slutkoncentrationerne svarende til en OD fra 0,1 til 0,0125. Alle fortyndinger blev udført i sterilt 0,9 % NaCl-opløsning.

Ved afprøvning af testmetode med konserveringsmiddel anvendte vi

---

<sup>6</sup> Sigma-Aldrich product information: 54232 Lactose TTC Agar with Tergitol<sup>®</sup>-7 (M-Tergitol-7 Agar with Meat Extract)

autoklaveret maling, der først var fortyndet med 3 dele ionbyttet vand. Som konserveringsmiddel blev methylparaben benyttet, og som indikator for vækst anvendte vi TTC i en slutkoncentration på 0,01 %. I mikrotiterbakken blev methylparaben fortyndet til koncentrationer fra 8000 ppm til 125 ppm. Der blev kun anvendt de to bakteriestammer, der før påsætning var fortyndet til  $OD_{590} = 0,5$ . I bakken blev den endelige koncentration svarende til  $OD=0,13$  i alle brønde. Ved påsætning af malingen blev slutfortyndingen 1/8 i alle brønde. Alle fortyndinger blev udført i sterilt 0,9 % NaCl-opløsning. Der blev lavet 8-dobbelt bestemmelse.

## Resultater og diskussion

### *Konserveringsmidlers effekt på mikrobiel vækst*

Ved test af natriumbenzoats, kaliumsorbat, natriumpropionats og methylparabens indvirkning på væksten af *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Cladosporium* og *Aspergillus* sås en varierende effekt, og MIC-værdier fra vækstforsøgene er angivet i tabel 1. Methylparaben var det mest effektive af de fire konserveringsmidler, og med en enkelt undtagelse hæmmede stoffet væksten af samtlige testorganismer ved alle tre pH-niveauer. MIC-værdier for stoffet svingede mellem 250 og 2000 ppm og var uafhængigt af pH. Natriumbenzoat og kaliumsorbat hæmmede væksten af *Pseudomonas* og *Cladosporium* og havde med MIC-værdier på hhv. 4000 ppm og 500 ppm størst effekt ved pH 4. Dette stemmer overens med, at dette pH-niveau ligger under begge midlers pKa-værdi. Allerede ved pH 5 sås for de to midler en stigning i MIC-værdien til hhv. 8000 og 4000 ppm og ved pH 7 var effekten

aftaget helt. Natriumpropionat udviste samme tendens, men havde med en MIC-værdi på 1000 ppm kun effekt over for *Pseudomonas* og blot ved det laveste pH-niveau.

		MIC efter 4 døgn ppm konservering			
		NB	KS	NP	MP
pH 4	Micr.	-	-	-	2000
	Pseu.	4000	4000	1000	250
	Clad.	500	500	-	1000
	Asp.	-	-	-	1000
pH 5	Micr.	-	-	-	-
	Pseu.	8000	8000	-	1000
	Clad.	4000	4000	-	500
	Asp.	-	-	-	1000
pH 7	Micr.	-	-	-	1000
	Pseu.	-	-	-	2000
	Clad.	-	-	-	1000
	Asp.	-	-	-	1000

Tabel 1: MIC-værdier for natriumbenzoat (NB), kaliumsorbat (KS), natriumpropionat (NP) og methylparaben (MP) bestemt på *Micrococcus* (Micr.), *Pseudomonas* (Pseu.), *Cladosporium* (Clad.) og *Aspergillus* (Asp.) efter 4 døgn vækst. (-): ingen effekt.

Effekten afhænger altså af pH-niveauet for tre ud af de fire konserveringsmidler og bekræfter således, at disse tre er funktionelle på den udissoциerede form, som forekommer ved pH under stoffernes pKa-værdier. Natriumbenzoat og kaliumsorbat har begge lavere pKa-værdier end Natriumpropionat, men er mere virkningsfulde i hæmningen af mikroorganismernes vækst ved pH 5, hvilket indikerer en virkningsmekanisme, der ikke udelukkende baserer sig på dissocierings-niveauet.

### *Konserveringsmidlers synergistiske*

*effekt på mikrobiel vækst i kombination* Natriumbenzoat og kaliumsorbat var de to foretrukne konserveringsmidler, der hæmmede væksten af flest testorganismer og derfor blev en mulig

synergistisk effekt af disse to stoffer testet. Dette illustreres med FIC-indekset, som blev beregnet for de to konserveringsmidler (se tabel 2).

		FIC efter 4 døgn	
		ppm NB/KS	Indeks
pH 4	Micr.	500/125	0,04
	Pseu.	1000/1000	0,5
	Clad.	125/125	0,5
	Asp.	4000/125	0,3
pH 5	Micr.	-	-
	Pseu.	4000/1000	0,6
	Clad.	250/2000	0,6
	Asp.	-	-
pH 7	Micr.	-	-
	Pseu.	-	-
	Clad.	-	-
	Asp.	-	-

Tabel 2: FIC-indeks værdier for natriumbenzoats (NB) og kaliumsorbats (KS) samlede effekt på væksten af *Micrococcus* (Micr.), *Pseudomonas* (Pseu.), *Cladosporium* (Clad.) og *Aspergillus* (Asp.) efter 4 døgn. (-): ingen effekt.

FIC-indekset viser en synergistisk effekt af de to midler på alle fire mikroorganismer ved pH 4 – og igen ses samme billede, at når pH øges, bliver virkningen dårligere. Ved pH 5 er effekten additiv og kun på *Pseudomonas* og *Cladosporium*, og ved pH 7 ses ingen effekt på nogle af mikroorganismene. Det vil således ikke med de tre konserveringsmidler natriumbenzoat, kaliumsorbit og natriumpropionat – hverken alene eller som kombination af de to førstnævnte – være muligt at opnå en tilstrækkelig hæmning af mikroorganismers vækst i maling med mindre pH sænkes til 4 i malingen. Hvis de øvrige bestanddele af malingen tillader en sænkning af pH til 4, vil en kombination af natriumbenzoat

og kaliumsorbit i koncentrationerne 4000 ppm/1000 ppm kunne give beskyttelse mod i hvert fald et udvalg af forskellige mikroorganismer.

#### Metode til direkte bestemmelse af mikrobiel vækst i maling

Ved inokulation med *Micrococcus* og *Pseudomonas* i maling tilsat TTC kunne der observeres vækst i malingen og dette kom til udtryk som en rødfarvning af brøndene (se figur 1). Malingen var eneste næringskilde for bakterierne, og det var tydeligt at se, at intensiteten af den røde farve steg med en øget koncentration af maling. Farveudviklingen havde også en direkte sammenhæng med inokulationsmængden.



Figur 1: Vækst af *Pseudomonas* efter 1 døgn i fortyndinger af naturmaling tilsat TTC.

Med henblik på at etablere de mest optimale forsøgsbetingelser for afprøvningen af metoden med konserveringsmiddel, blev det vurderet at en tilfredsstillende rødfarvning var opnået i brønde (markeret med rød cirkel), hvor malingen var fortyndet x8 og tætheden af bakterier var omkring OD 0,1 til start. De to anvendte bakteriestammer bekræftede altså forventningen om, at reduktionen af TTC til formazan kunne bruges som en

indikator for nogle former for bakteriel vækst.

#### *Test af methylparabens effekt på mikrobiel vækst i maling*

Methylparaben blev valgt til afprøvning af testmetoden med konserveringsmiddel, da tidligere forsøg havde vist, at stoffet kunne hæmme væksten af de to bakterier *Micrococcus* og *Pseudomonas*.



Figur 2: Vækst af *Pseudomonas* i maling tilsat methylparaben.

Forskellige koncentrationer af methylparaben blev anvendt og med tidligere bestemte niveauer af maling og bakterier. Vækstforsøgene viste tydelig rødfarvning af brønde med et lavere indhold af methylparaben (se figur 2), men efter 1 døgns inkubation kunne det observeres, at methylparaben i koncentrationerne 4000 ppm og 2000 ppm havde en hæmmende effekt på væksten af *Pseudomonas*. Yderligere forsøg vil vise om den observerede væksthæmning af bakterier i fortyndet maling også kan gentages i ufortyndet maling og metoden skal også testes igennem med flere forskellige konserveringsmidler og flere typer bakterier.

#### **Konklusion**

Effekten af natriumbenzoat, kaliumsorbit, natriumpropionat og

methylparaben er blevet testet på *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Cladosporium* og *Aspergillus* i maling ved pH 4, pH 5 og pH 7. Det kan konkluderes, at det af de testede konserveringsmidler kun er methylparaben, der virker hæmmende på alle de anvendte mikroorganismer. Natriumbenzoats og kaliumsorbitats synergistiske effekt ses på alle fire mikroorganismer ved pH 4.

En metode til direkte påvisning af bakterievækst i maling ved at tilsætte TTC er blevet udviklet. Det kunne konstateres, at der er en direkte sammenhæng mellem rødfarvning, koncentration af maling og inokulationsmængde af bakterier. Metoden kunne også bruges til at vise methylparabens hæmmende effekt på væksten af *Pseudomonas*.

## Bilag

Figur 1: Eksempel på opsætning af plade til test af konserveringsmidlernes effekt

### Pseudomonas aeruginosa i M9GY - pH 7

Natriumbenzoat							Natriumpropionat				
8000ppm	4000ppm	2000	1000	500	250	125	8000	4000	2000	1000	500
8000ppm	4000ppm	2000	1000	500	250	125	250	125	Ingen kons. + mikro-organisme	Ingen kons. Ingen mikro-organisme	Ingen mikro-organisme + kons. 8000 ppm

Kaliumsorbit

Figur 2: Eksempel på opsætning af plade til test af konserveringsmidlernes effekt i kombination.

### Pseudomonas aeruginosa i M9GY - pH 7

Kaliumsorbit							Methylparaben				
16000 ppm							8000 ppm				
8000							4000				
4000							2000				
2000							1000				
1000							500				
500							250				
250							125				
125/16.000	8000	4000	2000	1000	500	250	125	-kons+Mikro	-kons-mikro	Tom	+mp-Mikro

Figur 3: Billede af en opsætning til udvikling af testmetode for vækst i maling

Bakterier (svarende til OD) x 11												
Hverken maling eller bakterier	1/4096	1/2048	1/1024	1/512	1/256	1/128	1/64	1/32	1/16	1/8	0,1/1/4	Maling x 8
											0,1	
											0,05	
											0,05	
											0,025	
											0,025	
											0,0125	
Ingen bakterier - kun fortyndet maling												