



Cool fruits

Effekter av lagringstid samt lagringstemperatur på förekomst av Listeria monocytogenes i färsk fruktcocktail

Beatrix Alsanus, Emina Mulaosmanovic

Sveriges Lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för landskapsarkitektur, trädgårds- och växtproduktionsvetenskap
Landskapsarkitektur, trädgård, växtproduktionsvetenskap: rapportserie
Rapport 2022:10
Alnarp 2022



Cool fruits – Effekter av lagringstid samt lagringstemperatur på förekomst av *Listeria monocytogenes* i färsk fruktcocktail

Cool fruits – impact of storage length and temperature of raw fresh cut fruit and fruit cocktail on Listeria monocytogenes

Beatrix Alsanius, <https://orcid.org/0000-0001-6300-2829>, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för Biosystem och Teknologi

Emina Mulaosmanovic, <https://orcid.org/0000-0003-3169-8336>, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för Biosystem och Teknologi

Utgivare: Fakulteten för landskapsarkitektur, trädgårds- och växtproduktionsvetenskap, Sveriges lantbruksuniversitet

Utgivningsår: 2022

Utgivningsort: Alnarp

Illustration: Beatrix Alsanius

Serietitel: Landskapsarkitektur, trädgård, växtproduktionsvetenskap: rapportserie

Delnummer i serien: 2022:10

DOI: <https://doi.org/10.54612/a.36vkme5hjo>

Nyckelord: abiotiska betingelser, "convenience food", kyltemperatur, färsk fruktsallad, *Listeria monocytogenes*, provokationsstudie

© 2022 (Alsanius, Beatrix; Mulaosmanovic, Emina)

Detta verk är licenserat under CC BY 4.0. se <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Sammanfattning

Färska fruktsallader (*fruktcocktail*) efterfrågas av konsumenter. Med dagens ansträngda elpriser ställs frågan om kyltemperaturen under framställning, transport och display i butiken skulle kunna höjas från 4 till 8 °C utan att äventyra livsmedelssäkerheten för dessa produkter. Föreliggande rapport bygger på en litteraturstudie och en provokationsstudie, där den köldtoleranta (*psykrofila*) organismen *Listeria monocytogenes* användes som modellorganism. Litteraturstudien genomfördes som en systematisk litteratursökning i databasen Web-of-Science. I den experimentella delen studerades tillväxtbeteendet av *L. monocytogenes* med hänsyn till lagringstemperatur och lagringstid i en färsk fruktcocktail bestående av ananas, röda äpplen, nätmelon och röda druvor. Den experimentella delen byggde på frågeställningen om lagringstemperaturen kan höjas från 4 °C till 8 °C samt från en rekommenderad lagringslängd på 4 dagar till 8 dagar, med hänsyn till förekomst av *L. monocytogenes*.

En klinisk stam av *L. monocytogenes* inokulerades i färdiga råa fruktsallader. Tre temperaturregimer tillämpades: 4 °C i åtta dagar, 8 °C i åtta dagar samt 4 °C i ett dygn följt av 8 °C under återstående lagringstid på totalt åtta dagar (så kallad dynamisk temperaturregim). Vi fann att modellorganismen hade förökat sig efter åtta dagars lagringstid i samtliga behandlingar, dock avsevärt långsammare vid lagring i 4 °C, jämfört med kontinuerlig lagring i 8 °C samt den dynamiska behandlingen. Vid 4 °C lagringstemperatur visade *L. monocytogenes* en tillväxtpotential av knappt ett halvt log-värde, samt med log 1,37 respektive log 1,23 vid 8 °C lagringstemperatur respektive dynamisk lagring, trots att fruktsalladens pH låg under minimi-kraven för *L. monocytogenes*. I synnerhet i behandlingarna med högre temperatur förekom en massiv uppförökning av jästsvampar. Utifrån föreliggande resultat av litteraturundersökningen förordar vi ingen förhöjning av lagringstemperatur eller förlängning av lagringstid.

Nyckelord: abiotiska betingelser, "convenience food", kyltemperatur, färsk fruktsallad, *Listeria monocytogenes*, provokationsstudie

Summary

Fresh cut fruit cocktails are in demand by consumers. With today's high electricity prices, the question arises whether the cooling temperature during processing, transport and in-store display could be raised from 4 to 8°C without compromising the food safety of these products. The present report is based on a literature review and a challenge study, using the psychrophilic organism *Listeria monocytogenes* as a model organism. *L. monocytogenes* is able to grow at low temperature (temperature minimum: -1.5 °C). The literature study was conducted as a systematic literature search in Web-of-Science. In the challenge study, the growth behaviour of *L. monocytogenes* was examined with respect to storage temperature and storage time in a fresh fruit cocktail consisting of pineapples, red apples, net melon and red grapes. The experimental part was based on the question whether the storage temperature can be increased from 4 °C to 8 °C and from a recommended storage length of 4 days to 8 days, in particular with regard to *L. monocytogenes*.

A clinical strain of *L. monocytogenes* was inoculated into pre-cut and packaged fruit cocktail. Three temperature regimes were applied: 4 °C for eight days, 8 °C for eight days and 4 °C for one day followed by 8 °C for the remaining storage time of eight days in total (dynamic temperature regime). We found that the model organism had multiplied after eight days of storage in all treatments, but significantly slower in the continuous 4 °C storage treatment, compared to the continuous 8 °C storage and the dynamic treatment. At 4 °C storage temperature, *L. monocytogenes* showed a growth potential of almost half a log value, and with log 1.37 and log 1.23 at 8 °C storage temperature and dynamic storage, respectively, despite the fact that the pH of the cocktail was below the minimum requirements for *L. monocytogenes*. Especially in the higher temperature treatments, there was a massive multiplication of yeasts adventuring package integrity and desirability. Based on the present results of the literature survey, we do not recommend increasing the storage temperature or extending the storage time.

Keywords: abiotic conditions, challenge test, convenience food, cooling temperature, fresh-cut fruit, *Listeria monocytogenes*

Innehåll

1. Inledning	11
1.1. Bakgrund	11
1.2. Syfte.....	13
2. Resultat	14
2.1. Litteraturstudie.....	14
2.1.1. Processer i färska och skurna frukter under beredning och efterskördshantering.....	14
2.1.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	16
2.1.3. Effekt av temperatur på <i>Listeria monocytogenes</i> i färska fruktsallader 17	17
2.2. Provokationsstudie	22
2.2.1. Tillväxt av <i>L. monocytogenes</i> under laboratoriebetingelser	22
2.2.2. Tillväxt av <i>L. monocytogenes</i> i färska fruktsallader vid olika temperaturregimer	23
2.2.3. Tillväxt av övriga mikroorganismer i färska fruktsallader vid olika temperaturregimer	26
2.2.4. Abiotiska faktorer	27
3. Diskussion och slutsatser	29
4. Material och metoder	32
4.1. Litteraturstudie.....	32
4.2. Provokationsstudie	33
4.2.1. Förundersökning	33
4.2.2. Genomförande	33
4.2.3. Analys och beräkning	34

Tabeller

Tabell 1 Kardinalbetingelser (minimum, optimum, maximum för temperatur, pH, saltkoncentration och vattenaktivitet) för tillväxt av <i>Listeria monocytogenes</i> (Beaufort et al., 2014).....	16
Tabell 2 Effekt av temperatur på <i>Listeria monocytogenes</i> på olika fruktmatrix. Temperatur (°C) och tid (h) indikerar temperaturregim och varaktighet av lagringen. Mängden av <i>L. monocytogenes</i> i början och slutet av lagringstiden redovisas i levande celltal (log colony-forming units, log CFU/g frukt, om avvikande enhet angivits). Tillväxtpotentialet (δ) är differensen i modellorganismens mängd mellan provokationens start och slut och uttrycks i log CFU/g frukt om ej annorlunda angiven. Ett negativt värde för tillväxtpotentialet betyder att modellorganismens förekomst sjönk.	19
Tabell 3 Tillväxtparametrar för den omarkerade respektive markerade <i>Listeria monocytogenes</i> stammen. Stammarna odlades upp i Trypton Soja Buljong vid 37 °C.....	23
Tabell 4 Tillväxtparametrar för <i>L. monocytogenes</i> och heterotrofa bakterier i skurna färska fruktcocktail vid lagring under 8 dagar vid 4 °C, 8 °C respektive i med dynamisk temperaturstyrning (dag 1: 4 °C; övriga dagar: 8 °C). Ekvationerna som ligger till grund till beräkning av de olika parametrarna redovisas under avsnitt "Beräkningar" i kapitel 4	26
Tabell 5 Abiotiska faktorer i fruktcocktails vid studiens start (dag 0) och slut (dag 8). Skurna färska fruktcocktails förvarades kontinuerligt vid 4°C respektive 8 °C i åtta dagar, eller i dynamisk temperaturstyrning med 4 °C under dag 1 och 8 °C under de resterande sju dagarna. Värden inom samma rad och lagringstemperatur som åtföljs av olika bokstäver skiljer signifikant enligt envägs-Anova och Tukey-test ($p < 0.05$).....	28
Tabell 6 Koncept och söktermer samt antal träffar i Web of Science sökningarna	33
Tabell 7 Provtagnings-schemat vid provokation med <i>Listeria monocytogenes</i>	34
Tabell 8 Inkubationsbetingelser (temperatur, °C; längd, h) för de heterotrofa bakterier (Trypton Soja Agar), <i>Listeria monocytogenes</i> (Harlequin Agar) och jästsvampar (Jäst-malt-agar).	35

Figurer

Figur 1 Beredningssteg vid beredning av skurna, färska fruktcocktails (fruktsallader). (Illustration: B. Alsanus; ritat i Biorender.com; licens ID IL24LKL MIR).	11
Figur 2 Färska skurna fruktcocktails i en öppen butikskyldisplay (A) och ett exempel på en färsk skuren fruktcocktail bestående av melon, ananas, äpple och röda druvor (B). Sammansättningen i fruktcocktailen visat i B motsvarar den som användes i föreliggande studie, men produkten i föreliggande studie kom från en svensk tillverkare och beredd färskt för studiens ändamål. Temperaturdisplayen i föreliggande butikshylla (C) visar 1,9 °C. (foto: B. Alsanus).....	12
Figur 3 Processer och förändring av färska frukter och grönsaker efter skörd och under beredning (enligt Artés and Allende, 2005 modifierat)	14
Figur 4 Tillväxt av <i>L. monocytogenes</i> (Log CFU ml ⁻¹) under laboratoriebetingelser (lila: vildtypsstam; orange: markerad stam).....	22
Figur 5 Förekomst av <i>Listeria monocytogenes</i> i skurna fruktcocktails under åtta dagar lagring vid 4 °C (grön linje), 8 °C (lila linje) samt ett dygn vid 4 °C och sju dygn vid 8 °C (orange linje). Den färska fruktcocktailen bestod av röda äpplen, röda druvor, nätmelon o och ananas. Pilen indikerar tillfället för en försöksteknisk avvikelse som förmodligen ledde till en överskattning av det verkliga värdet.	24
Figur 6 Förekomst av <i>L. monocytogenes</i> (A) och heterotrofa bakterier (B) (Log CFU g frukt ⁻¹) vid lagring i åtta dagar vid 4 °C (grön), 8 °C (lila) respektive 4 °C under dag 1 och 8 °C under den resterande tiden (orange). Olika bokstäver över staplarna indikerar signifikanta skillnader enligt Anova och general linear model ($p < 0.05$).	25
Figur 7 Förekomst av jästsvampar i fruktsallad som lagrats i åtta dagar vid 4 °C, 8 °C eller med dynamisk temperaturstyrning (dag 1: 4 °C; dag 2-8: 8 °C). Cocktailen hade efter packning inokulerats med <i>L. monocytogenes</i> . Olika bokstäver över staplarna indikerar signifikanta skillnader enligt Anova och general linear model ($p < 0.05$).	27

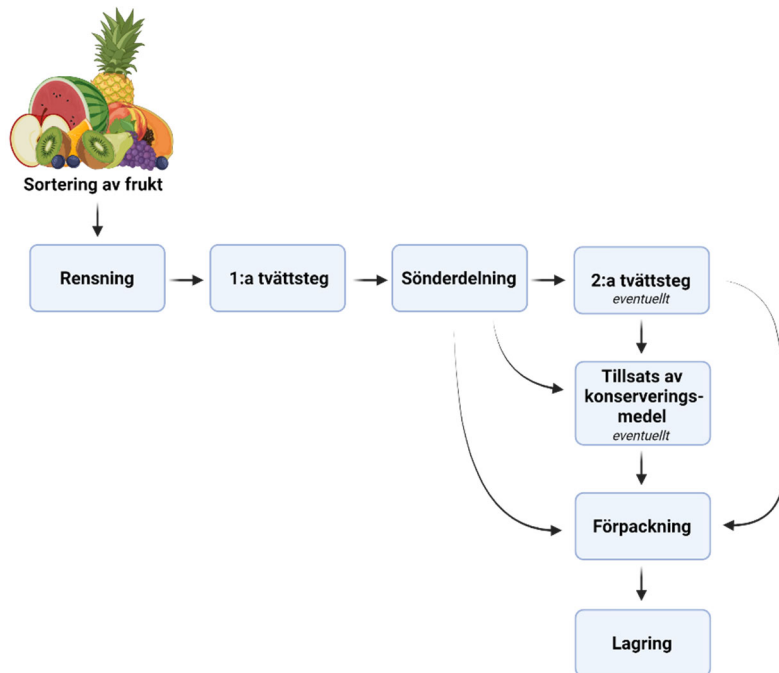
Förkortningar

CFU	Colony-forming unit (levande celltal)
EFSA	European Food Safety Agency
RASFF	Rapid Alert System Food and Feed (EUs system för snabb informationsöverföring vid förekomst av livsmedelssäkerhetsrisker i livsmedelssystemet)

1. Inledning

1.1. Bakgrund

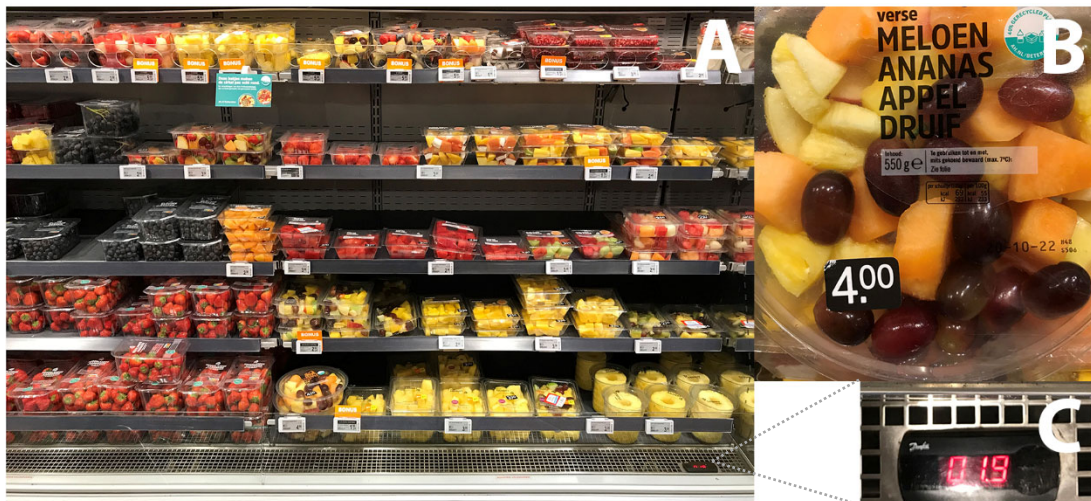
Frukt och grönsaker är rika på fibrer, bioaktiva ämnen och mineraler och är grundläggande för en hälsosam diet. Livsmedelsverket rekommenderar ett dagligt intag av 500 g frukt och grönsaker (Brugård Konde et al., 2015). Under de senaste åren har färdig skuren, färsk frukt antingen som enskild frukt eller fruktmix (*fruktcocktail*) blivit ett uppskattat livsmedel som motsvarar den moderna livsstilen (Giannakourou and Tsironi, 2021, Soliva-Fortuny and Martín-Belloso, 2003). De saluförs portionsförpackade via detaljhandel, snabbrestauranger och kaféer eller i större kantinförpackningar till restauranger, storkök, cateringföretag eller självplockdiskar (bufféer). Beredning och förpackning av färdigt skurna, färska fruktcocktails sker ofta centralt och transporteras sedan över kortare eller längre sträckor till butiker. Beredningsstegen presenteras i Figur 1.



Figur 1 Beredningssteg vid beredning av skurna, färska fruktcocktails (fruktsallader). (Illustration: B. Alsanus; ritat i Biorender.com; licens ID IL24LKMIR).

Frukt som används för färsk fruktsallad tvättas före beredning. På så sätt tas grova föroreningar bort. Tvätt av frukt eliminerar dock inte samtliga mikroorganismer, och det finns en fara att mikrobiella föroreningar överförs från fruktskalet till fruktköttet med skärverktygen. Vid beredning av färsk fruktsallad utsätts frukten inte för någon annan behandling som tar bort eller bromsar mikrobiell tillväxt (t.ex. värmebehandling). Tillsatser till tvättvattnet (t.ex. klorin) är inte tillåtna i Sverige. En åtgärd för att bibehålla fruktsalladens fräschör och minska risken för matsmittor är kylning i en obruten kylkedja (beredning, transport, butiksdisk) (Siddiqui, 2020) (Figur 2). På så sätt kan också produktens hållbarhet förlängas (Chen et al., 2020, Ferrante and Maggioro, 2007) och matsvinn minskas.

Med dagens ansträngda elpriser ställs frågan om kyltemperaturen under beredning, transport och display i butiken skulle kunna höjas från 4 till 8 °C utan att äventyra livsmedelssäkerheten för dessa produkter.



Figur 2 Färsk skurna fruktcocktails i en öppen butikskyldisplay (A) och ett exempel på en färsk skuren fruktcocktail bestående av melon, ananas, äpple och röda druvor (B). Sammansättningen i fruktcocktailen visat i B motsvarar den som användes i föreliggande studie, men produkten i föreliggande studie kom från en svensk tillverkare och bereddes färskt för studiens ändamål. Temperaturdisplayen i föreliggande butikshylla (C) visar 1,9 °C. (foto: B. Alsanius).

1.2. Syfte

Frågeställningen för föreliggande undersökning var om

- 1) lagringstemperatur för färsk fruktcocktail bestående av ananas, röda äpplen, nätmelon och röda druvor kan utökas från 4 °C till 8 °C och om
- 2) den rekommenderade lagringstiden kan förlängas från 4 dagar till 8 dagar.

Detta i synnerhet med hänsyn till *Listeria monocytogenes*, en bakterie som naturligt kan förekomma på frukt och grönsaker, som överlever och växer till vid låga temperaturer och som framkallat utbrott relaterat till konsumtion av nätmelon (cantaloupe) (McCollum et al., 2013) och äpple (Carstens et al., 2019).

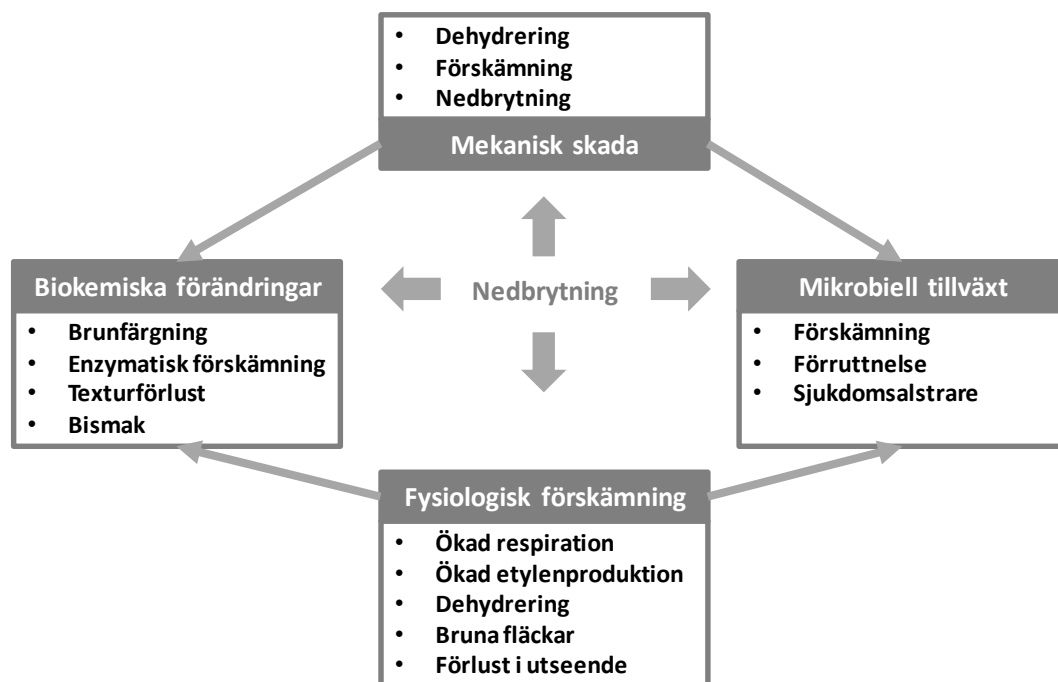
2. Resultat

2.1. Litteraturstudie

2.1.1. Processer i färska och skurna frukter under beredning och efterskördshantering

Kylning av intakta och skurna färska frukter fyller två grundläggande funktioner (Figur 3)

- 1) Fördröjning av nedbrytningsprocessen och
- 2) Bromsad mikrobiell tillväxt.



Figur 3 Processer och förändring av färska frukter och grönsaker efter skörd och under beredning (enligt Artés and Allende, 2005 modifierat)¹

¹ Bilden är identiskt med figur 1 i Alsanius et al. 2022. Green wheel. LTV rapport 2022:6, sida 29.

Dessa två processer, nedbrytning av fruktvävnaden och mikrobiell tillväxt, är nära kopplade tillvarandra. Nedbrytningen kan vara ett resultat av en biokemisk process (fysiologisk och enzymatisk nedbrytning/försämning), men nedbrytningsprocessen involverar också mikroorganismer. Olika typer av organismer deltar i processens olika stadier. Mekanisk skada på intakta frukt främjar nedbrytningen (Iturralde-García et al., 2022).

Då frukten sönderdelas (skivas, strimlas, tärnas), orsakas en aktiv mekanisk skada på fruktvävnaden, alltså ett gigantiskt sår (Soliva-Fortuny and Martín-Belloso, 2003). Frukttvävnaden brunfärgas, dehydreras och tappar i textur samtidigt som fruktsaft rik på kolhydrater läcker ut. Den specifika ytan, som kan utnyttjas av mikroorganismer, blir större; dels genom den initiala sönderdelningen och senare genom den alltmer framskridande nedbrytningen och förruttnelsen. Ur mikroorganismerna perspektiv utgör en såryta en idealisk plats för att slå sig ner och för att ta för sig av den otroligt näringsrika miljön. De goda livsvillkoren leder till att mikroorganismer kan föröka sig massivt; det gynnar sådana organismer som har de bästa förutsättningarna att nyttja dem. Mikroorganismer deltar i denna process därför att denna miljö tillhandahåller rikligt med lättillgängliga näringsresurser. En liten andel av dessa organismer (t.ex. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp.) kan orsaka sjukdom hos människor.

En begränsande faktor för färska skurna fruktcocktails är deras begränsade hållbarhet (*shelf-life*) (Soliva-Fortuny and Martín-Belloso, 2003). Hållbarheten av skurna frukter kan visserligen påverkas av bland annat fruktens mognadsstadium (Gorny et al., 2000, Gorny et al., 1998, Gorny et al., 1999, Colás-Medà et al., 2015), t.ex. på omogna päron är tillväxten av *L. monocytogenes* långsammare än på mogna päron. Beredning av fruktsallader på omogna frukter är däremot inte ett alternativ. Kylning bromsar dels den fysiologiska och enzymatiska nedbrytningsprocessen och mikroorganismernas metabolism, därför rekommenderas temperaturer < 5 °C för skuren frukt från tempererat klimat (Gross et al., 2016) under lagring och distribution. Generellt kan konstateras att den visuella kvaliteten sjunker innan den nutritionella kvaliteten (t.ex. halten C vitamin, karotenhalten) gör det (Gil et al., 2006). Amaro et al. (2018) konstaterade att respiration och därmed koldioxidhalten ökade signifikant när melon (cantaloupe; *Cucumis melo* var. *cantaloupensis*) lagrades vid 5 °C respektive 10 °C, jämfört med kontrollen (0 °C). Likaså försämrades fruktköttets fasthet vid lagring i 5 °C respektive 10 °C jämfört med den nollgradiga kontrollen. Men försämningshastigheten skiljer sig mellan olika fruktslag. Kortast hållbarhet med hänsyn till visuell kvalitet (frukttvävnadens utseende och fasthet) hade skuren färsk kiwi lagrad vid 5 °C (<6 dagar), medan skuren ananas, nätmelon och jordgubbar tappade fräschören inom 9 dagar. Däremot var skurna bitar av vattenmelon och mango fortfarande acceptabla efter 9 dagars lagring vid 5 °C (Gil et al., 2006).

2.1.2. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes är en psykrotrof bakterie, vilket innebär att den förmår att växa till vid låga temperaturer. För *L. monocytogenes* specifikt rör det sig om en minimitemperatur på -1.5 °C. Förutom sin förmåga att leva och föröka sig vid låga temperaturer, är *L. monocytogenes* fakultativt anaerob, vilket innebär att den är kapabel att både växa i närvaro och frånvaro av syre (t.ex. vakuum). Den behöver en relativt hög vattenaktivitet för optimal tillväxt (99%), men klarar av växa till vid relativt höga saltkoncentrationer. Kardinalpunkter för tillväxt av *L. monocytogenes* presenteras i Tabell 1.

Tabell 1 Kardinalbetingelser (minimum, optimum, maximum för temperatur, pH, saltkoncentration och vattenaktivitet) för tillväxt av *Listeria monocytogenes* (Beaufort et al., 2014)

		Tillväxt		
		Minimum	Optimum	Maximum
Temperatur	°C	-1,5	30,0-37,0	45,0
pH		4,2-4,3	7,0	9,4-9,5
Vattenaktivitet a_w		0,93	0,99	>0,99
Saltkoncentration	%	<0,5	0,7	12-16

Alla dessa faktorer gör att bakterien är en utmaning i samtliga delar av berednings-, lagrings- och distributionskedjan ända fram till slutkonsumenten. Det bör understrykas i detta sammanhang att skurna fruktbitar är en idealisk näringskälla för *L. monocytogenes*, i och med att de läcker fruktsaft rik på kolhydrater och fruktbitarna ur en bakteries perspektiv är stora näringsrika sårytor som kan invaderas och koloniseras utan större ansträngningar (Mulaosmanovic et al., 2021).

Bakterien är naturligt förekommande i jord, i vatten och på växter (inkl. frukt), men också mycket vanlig i produktionsmiljöer för livsmedel, inkl. produktionsmiljöer för frukt (Tan et al., 2019). Förmågan att bilda biofilm varierar mellan olika material och påverkas av temperatur (Di Bonaventura et al., 2008). Det har till exempel visats att *L. monocytogenes* trivs och förökar sig väl i utspädda extrakt från skal och fruktkött av nätmelon (Abeyundara et al., 2017). Detta faktum är kanske inget större problem för intakta ytor som rengörs på ett ändamålsenligt sätt, men problematiskt för skarv mellan ytor, i golvbrunnar och svåråtkomliga skrymslen, där de kan etablera sig och bilda biofilm.

Förekomsten av *Listeria* utbrott relaterade till frukt och grönt har ökat under de senaste åren, men enligt sammanställning av EFSA är RASFF notifikationer för frukt och grönsaker mycket lägre än de för andra färskprodukter (EFSA Biohaz panel et al., 2018). Under perioden 2008-2016 stod frukt och grönsaker för 2.6% av RASFF notifikationer, medan fisk och fiskprodukter, kött och köttprodukter och mejeriprodukter stod för respektive 41,7 %, 18.3 % och 27 % (EFSA Biohaz panel et al., 2018). Utbrott i USA under åren 2011 samt 2014/2015 som var relaterade

till nätmelon och äpple (Granny Smith, Royal Gala) har rönt internationellt stor uppmärksamhet (Carstens et al., 2019, McCollum et al., 2013).

Även om *L. monocytogenes* är en fara i samband med frukt, så är utbrott sällsynta. I en kanadensisk studie som omfattade 4691 fruktförpackningar kunde smittan påvisas i 0.51 % av proven, av dessa låg drygt 8% över gränsvärdet på 100 CFU/g frukt (Zhang et al., 2020). Vid endpoint undersökningar som genomfördes i Schweiz, där det i likhet med Sverige inte är tillåtet att använda desinfektionsmedel (t.ex. klorin) i sköljvattnet, konstaterades ingen förekomst av *L. monocytogenes* i några av de undersökta 64 proverna (Althaus et al., 2012). Däremot är påverkan av bakterien stor; den har hög dödlighet (25-30 %) och antal patienter som behöver stationär sjukhusvård är mycket hög (> 92 %) (Beaufort et al., 2014).

Listerios förekommer i två varianter. Som icke-invasiv variant orsakas febrig magsjuka som ofta går över av sig själv och inte kräver någon sjukhusvård. Den invasiva varianten är synnerligen lurig, i och med att den förmår att övervinna blod-hjärna-, blod-tarm- och blod-placenta-barriären (Wing and Gregory, 2002) samt orsakar hjärnhinneinflammation (meningit) och sepsis. Den drabbar främst äldre (> 65 år) och personer med nedsatt immunförsvar, t.ex. till följd av organtransplantation, nedsatt njur- och leverfunktion, inflammatorisk sjukdom, HIV/AIDS eller olika former av cancer. Också gravida kvinnor är i riskzonen. Listerios under graviditeten kan leda till missfall. Smittan kan också överföras till fostret som kan utveckla listerios under de första dagarna till veckorna efter födseln.

2.1.3. Effekt av temperatur på *Listeria monocytogenes* i färska fruktsallader

Skuren frukt har varit föremål för flera provokationsstudier med *Listeria* spp., där olika temperaturnivåer har tillämpats. Inte alla studier använder sig av *L. monocytogenes*, utan av ett icke patogent surrogat, nämligen *Listeria innocua*. Det är tveksamt i vilken utsträckning resultat från studier med surrogat kan jämföras ur ett livsmedelssäkerhetsperspektiv. Det är också viktigt att hålla i åtanke att frånvaro av kolonier på agarplattor (viable count; colony-forming unit, CFU) inte tvunget innebär frånvaro av levande celler. Stressade *L. monocytogenes* kan övergå i ett stadium med fysiologiskt intakta celler som dock inte kan odlas upp på agarplattor under laboratoriebetingelser (viable but non-culturable, VBNC) (Wideman et al., 2021). Sådan stress kan orsakas av ogynnsamma miljöbetingelser. Denna typ av stress kan leda till en korsrespons, vilket innebär att en stressfaktor inducerar tolerans mot en annan stressfaktor och följaktligen leder till en ökad motståndskraft (Francis et al., 2012).

Majoriteten av undersökningar har genomförts med enskilda skurna frukter. Betingelserna som använts i de olika studierna samt redovisas i

Tabell 2 med hänsyn till *L. monocytogenes* förökning. Äpple, päron, melon (honungs-, nät-, vattenmelon) och ananas har varit i fokus. Analys av de olika rapporterna i litteraturen visar att metodiken (val av fruktslag, sort, mognadsgrad, inokulationssätt, sönderdelningssätt och –grad, lagringstemperaturer, förbehandling, serovarer av *L. monocytogenes* respektive surrogat) varierar kraftigt. Därför är det svårt att jämföra resultaten mellan olika studier och att dra generella slutsatser. Tyvärr redovisas i vissa studier inte förekomsten av *L. monocytogenes* relaterat till vikt eller yta (t.ex. CFU/g eller log CFU/g), utan som CFU respektive log CFU per redovisat ämne (t.ex. testplugg eller helt äpple), vilket försvårar jämförelsen ytterligare.

Generellt sett bromsar, men förhindrar inte, låga temperaturer (4-5 °C), tillväxten av *L. monocytogenes* på frukt, medan temperaturer >8 °C främjar bakterien. I detta sammanhang förefaller ananas vara ett undantag. Vid samtliga temperaturnivåer sjönk förekomsten av *L. monocytogenes* påtagligt till ej påvisbara eller mycket låga nivåer (Huang et al., 2019).

Det verkar finnas samsyn kring att *L. monocytogenes* kan föröka sig massivt på nätmelon (Kroft et al., 2022, Amaro et al., 2018, Huang et al., 2019), och på vattenmelon (Huang et al., 2019). Däremot förefaller uppförökningen på färsk skuren honungsmelon vara något lägre än för de andra två melonarterna (Huang et al., 2019). Skillnader mellan melonslagen är utan biologisk relevans vid lagring i låga temperaturer (4 °C), medan skillnaderna vid 8 °C respektive 12 °C lagring är 10-15 gånger högre (1,2 respektive 1.5 log CFU/g frukt) vid lagring av nät- och vattenmelon vid 8 °C respektive 12 °C jämfört med honungsmelon vid motsvarande lagringstemperaturer (se Tabell 2). Även om denna skillnad inte stöds fullt ut av tillväxtmodellen för färsk skuren melon enligt Danluyk et al. (2014), beskriver modellen de generella tendenserna i uppförökning av bakterien vid olika lagringstemperaturer och –längder.

Tabell 2 understryker vikten av interaktioner mellan temperatur och fruktens mognadsgrad, sort, samt inokulationsplats (plats för kontaminering). Till exempel hos äpple, kunde en massiv uppförökning observeras vid lagring i 25 °C efter att *L. monocytogenes* inokulerats till fruktskalet av intakta Gala-äpplen, medan ingen nämnvärd uppförökning konstaterades efter en jämförbar kontaminering av sorten Granny Smith (Salazar et al., 2016). Samtidigt sjönk förekomsten av *L. monocytogenes* vid inokulering av fruktskaftet, oberoende av sort, vid lagring i 25 °C; däremot skedde ingen förändring i förekomsten vid samma inokulationsbetingelser och lagring av äpplesorten Gala vid 5 °C.

Dynamisk temperatursättning med en kortvarig behandling (2 h) av den kontaminerade produkten (ananas, melon) vid 35 °C följt av 4 °C som visat sig effektiv i samband med reduktion av *Salmonella* spp., hade ingen större inverkan på tillväxt av *L. monocytogenes* (Huang et al., 2019) jämfört med konstant lagring vid 4 °C.

Tabell 2 Effekt av temperatur på *Listeria monocytogenes* på olika fruktmatrix. Temperatur (°C) och tid (h) indikerar temperaturregim och varaktighet av lagringen. Mängden av *L. monocytogenes* i början och slutet av lagringstiden redovisas i levande celltal (log colony-forming units, log CFU/g frukt, om avvikande enhet angivits). Tillväxtpotentialet (δ) är differensen i modellorganismens mängd mellan provokationens start och slut och uttrycks i log CFU/g frukt om ej annorlunda angiven. Ett negativt värde för tillväxtpotentialet betyder att modellorganismens förekomst sjönk.

Fruktslag	Förbehandling		Temperatur	Tid	<i>Listeria monocytogenes</i>			Kommentar	Referens
	Storlek	Övrigt			Start	Slut	δ		
Ananas	8 cm ³	Tvättat i klorinhaltigt vatten (200 mg/L), torkat, skalat	4	168	2,51	ND ^B		Lagring efter skörd vid 4 °C följd Modellorganismer: blandning av tre <i>L. monocytogenes</i> serovarer (4b, 1/2a, 1/2b)	(Huang et al., 2019)
			8	168	2,51	ND ^B			
			12	168	2,51	ND ^B			
			35→4 ^A	168	2,51	0,8	-1,7		
Melon									
Honungsmelon	8 cm ³	Tvättat i klorinhaltigt vatten (200 mg/L), torkat, skalat	4	168	2,5-2,6	3,7	1,1-1,2	Lagring efter skörd vid 4 °C följd Modellorganismer: blandning av tre <i>L. monocytogenes</i> serovarer (4b, 1/2a, 1/2b)	(Huang et al., 2019)
			8	168	2,5	5,5	3,0		
			12	168	2,5	6,2	3,7		
			35→4 ^A	168	2,5	3,9	1,4		
Nätmelon (Cantaloupe)	8 cm ³	Tvättat i klorinhaltigt vatten (200 mg/L), torkat, skalat	4	168	2,5-2,6	4,1	1,5-1,6	Lagring efter skörd vid 4 °C följd Modellorganismer: blandning av tre <i>L. monocytogenes</i> serovarer (4b, 1/2a, 1/2b)	(Huang et al., 2019)
			8	168	2,5	6,72	4,2		
			12	168	2,5	7,7	5,2		
			35→4 ^A	168	2,5	4,2	1,7		
Vattenmelon	8 cm ³	Tvättat i klorinhaltigt vatten (200 mg/L), torkat, skalat	4	168	2,5-2,6	4,1	1,5-1,6	Lagring efter skörd vid 4 °C Modellorganismer: blandning av tre <i>L. monocytogenes</i> serovarer (4b, 1/2a, 1/2b)	(Huang et al., 2019)
			8	168	2,5	6,72	4,2		
			12	168	2,5	7,7	5,2		
			35→4 ^A	168	2,5	4,2	1,7		

Fruktslag	Förbehandling		Temperatur	Tid	<i>Listeria monocytogenes</i>			Kommentar	Referens
	Storlek	övrigt			Start	Slut	δ		
Persika	Stansade cylindrar (Ø 1,2 cm, höjd: 1 cm)	Tvättat dricksvatten; Ytsteriliserat 70% alkohol	20	48	4,3 ^C	7,4 ^C	3,1 ^C	Sort: Royal Glory, Elegant Lady, Merry O'Henry, Tardibelle, Placido, Roig d'Albesa Ingen postharvest behandling Modellorganism: <i>L. innocua</i>	(Alegre et al., 2013)
Päron	10 klyftor per frukt	Tvättat dricksvatten; torkat; Ytsteriliserat 70% alkohol	5	196	3,3 ^D	5,6 ^D	2,3 ^D	Sort: Conference Lagring efter skörd vid 1 °C följd av mognadsprovokation vid 20 °C Modellorganism: <i>L. monocytogenes</i> serovar 1/2a Kärnhus borttaget	(Colás-Medà et al., 2015)
				196	3,3 ^E	5,6 ^E	2,3 ^E		
			10	196	3,3 ^F	5,2 ^F	1,9 ^F		
				196	3,4 ^D	6,8 ^D	3,4 ^D		
			20	196	3,4 ^E	7,3 ^E	3,9 ^E		
				196	3,4 ^F	7,5 ^F	4,1 ^F		
				196	3,3 ^D	7,5 ^D	4,2 ^D		
				196	3,3 ^E	7,7 ^E	4,4 ^E		
Äpple	Stansade cylindrar (Ø 1,2 cm, höjd: 1 cm)	Tvättat dricksvatten; Ytsteriliserat 70% alkohol	20	48	4,4 ^C	7,1 ^C	2,7 ^C	Sort: Golden Delicious Ingen behandling efter skörd Modellorganism: <i>L. innocua</i>	(Alegre et al., 2013)
			5	216	2,7 ^G	4,7 ^G	2,0 ^G	Sort: Gala Inokulationsplats: fruktskal Modellorganism: kliniska stammar av <i>L. monocytogenes</i> (573-035, 576-043, 580-060) Inokulumdensitet: log 6,9 CFU/äpple	(Salazar et al., 2016)
				25	216	2,7 ^G	5,7 ^G		
25	216	4,8 ^G	5,1 ^G	0,3 ^G	Sort: Granny Smith				

Fruktslag	Förbehandling		Temperatur	Tid	<i>Listeria monocytogenes</i>			Kommentar	Referens
	Storlek	övrigt			Start	Slut	δ		
			5	216	5,7 ^G	5,9 ^G	0,2 ^G	Inokulationsplats: fruktskal Modellorganism: kliniska stammar av <i>L. monocytogenes</i> (573-035, 576-043, 580-060) Inokulumsdensitet: log 6,9 CFU/äpple	
			25	216	5,7 ^G	3,9 ^G	-1,8 ^G	Sort: Gala Inokulationsplats: skaft Modellorganism: kliniska stammar av <i>L. monocytogenes</i> (573-035, 576-043, 580-060) Inokulumsdensitet: log 6,9 CFU/äpple	
			25	216	6,7 ^G	6,0 ^G	-0,7 ^G	Sort: Granny Smith Inokulationsplats: skaft Modellorganism: kliniska stammar av <i>L. monocytogenes</i> (573-035, 576-043, 580-060) Inokulumsdensitet: log 6,9 CFU/äpple	

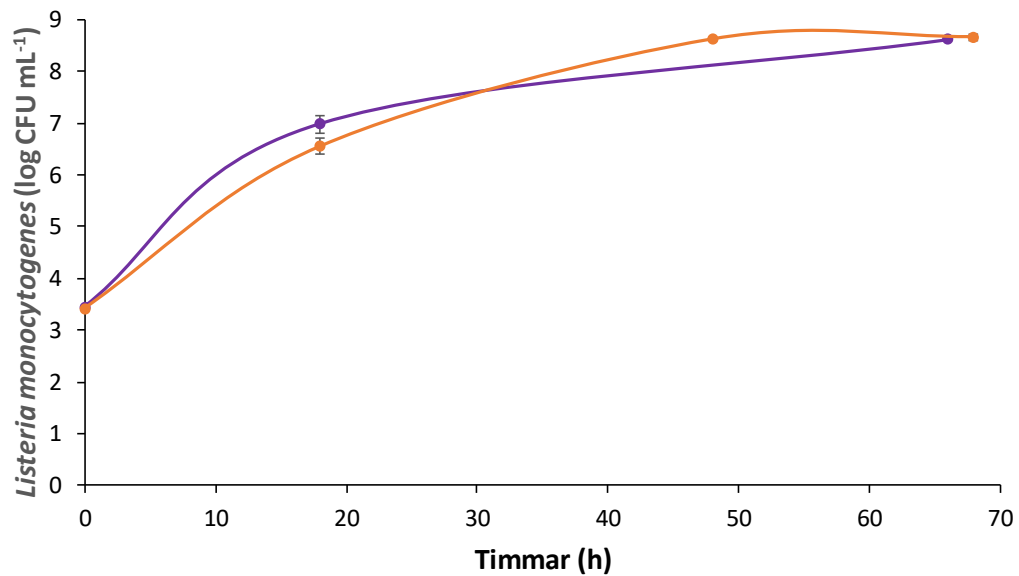
^A 35 °C i 2 timmar följd av 4 °C under den resterande lagringstiden; total varaktighet: 168 h (7 dagar); ^B ND= ej detekterbart; under detektionsgränsen; ^C CFU/stans;

^D omogna gröna päron; ^E mogna päron; ^F övermogna päron; ^G CFU/äpple

2.2. Provokationsstudie

2.2.1. Tillväxt av *L. monocytogenes* under laboratoriebetingelser

För att kunna spåra *L. monocytogenes* i fruktcocktails och utesluter inverkan av en potentiell bakgrundskontaminering med *L. monocytogenes*, taggades (*markerades*) organismen. Den markerade organismen uppvisade samma tillväxtförlopp som den omarkerade (Figur 4). Tillväxtparametrarna redovisas i Tabell 3.



Figur 4 Tillväxt av *L. monocytogenes* (Log CFU ml⁻¹) under laboratoriebetingelser (lila: vildtypsstam; orange: markerad stam)

Tabell 3 Tillväxtparametrar för den omarkerade respektive markerade *Listeria monocytogenes* stammen. Stammarna odlades upp i Trypton Soja Buljong vid 37 °C.

<i>Listeria monocytogenes</i>		
	Omarkerad	Markerad
Antal generationer (n)	17,21	17,41
Generationstid (g)¹	1,16	1,15
Specifik tillväxtkvot	0,26	0,26
Delningskvot	0,86	0,87

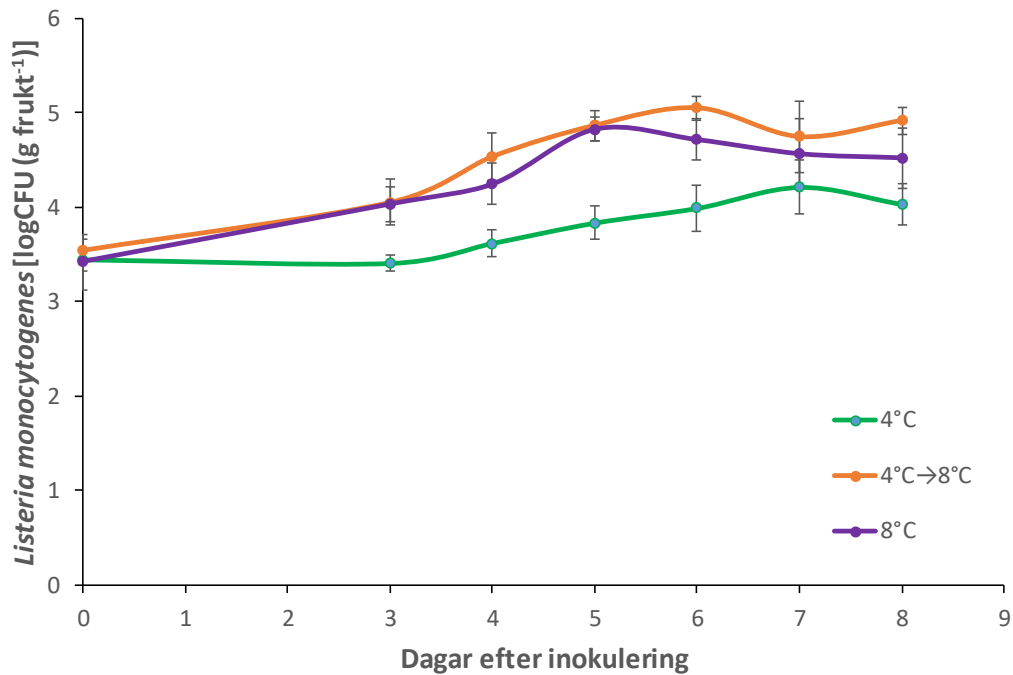
¹ timmar (motsvarar 69,87 min för den omarkerade vildtypen och 68,94 min för den markerade stammen)

2.2.2. Tillväxt av *L. monocytogenes* i färska fruktsallader vid olika temperaturregimer

Resultaten efter åtta dagars lagringstid visar att *L. monocytogenes* förökade sig i samtliga försöksled, dock avsevärt långsammare vid lagring i 4 °C, jämfört med kontinuerlig lagring i 8 °C, samt den dynamiska behandlingen. Halten av *L. monocytogenes* var signifikant lägre i frukt som förvarats vid den lägsta temperaturregimen, jämfört med de två andra temperaturbehandlingarna (Figur 5 och Figur 6A).

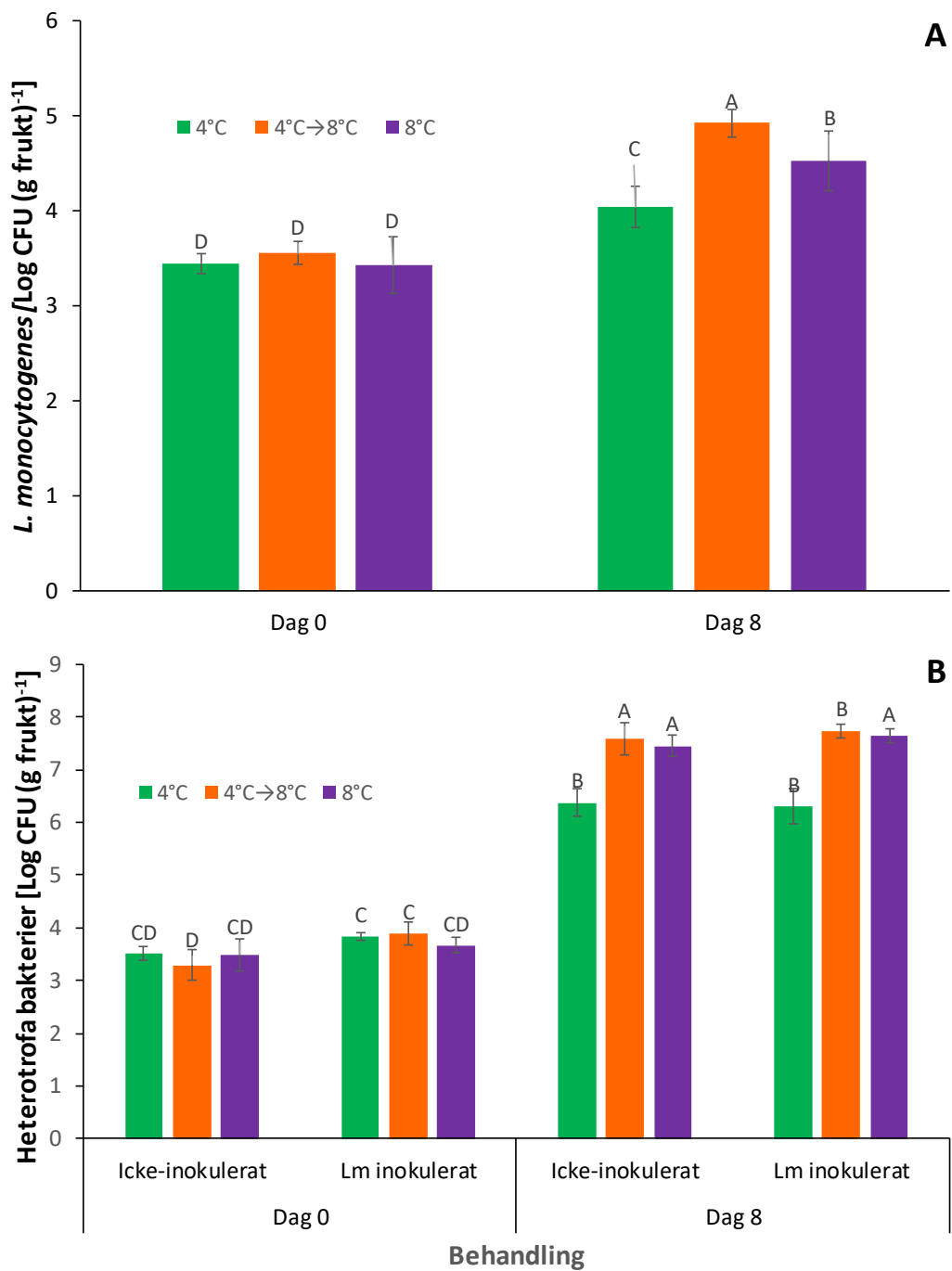
Vid lagring i 4 °C fanns inga signifikanta skillnader i halten *L. monocytogenes* under de första fem dagarna. Totalt hade förekomsten av *L. monocytogenes* ökat med knappt ett halvt log-värde vid 4 °C lagringstemperatur. Dag 7 uppstod försökstekniska problem vid avläsningen av det fyra-gradiga försöksledet; det redovisade värdet för detta försöksled dag 7 (markerat med pil) visar troligtvis en överskattning.

Vid lagring i 8 °C samt vid lagring med dynamisk temperaturreglering ökade förekomsten av *L. monocytogenes* med log 1,37 respektive log 1,23, d.v.s. antalet *L. monocytogenes* ökade mer än 10 gånger under observationsperioden. Signifikanta skillnader i *Listeria*-halt konstaterades redan vid de första två avläsningstillfällena (dag 0 och dag 3). Förekomst av *L. monocytogenes* i den dynamiska temperaturregimen hade en något svagare tillväxttakt jämfört med försöksledet som lagrades vid 8 °C. Skillnader mellan boxarna inom det dynamiska ledet var dock stora och inga signifikanta skillnader kunde konstateras mellan den högsta temperaturnivån och den dynamiska temperaturregimen.



Figur 5 Förekomst av *Listeria monocytogenes* i skurna fruktcocktails under åtta dagar lagring vid 4 °C (grön linje), 8 °C (lila linje) samt ett dygn vid 4 °C och sju dygn vid 8 °C (orange linje). Den färska fruktcocktailen bestod av röda äpplen, röda druvor, nätmelon o och ananas. Pilen indikerar tillfället för en försöksteknisk avvikelse som förmodligen ledde till en överskattning av det verkliga värdet.

Resultaten redovisade i Tabell 4 visar temperaturens substantiella effekt på tillväxt av *L. monocytogenes*. Medan tillväxten var mycket låg vid lagring av fruktsallad vid 4 °C (tid för fördubbling: 13,68 h), ökade den avsevärt när fruktsalladen förvarades vid högre temperatur. Tid för fördubbling var 2,5 gånger (vid 8 °C) respektive drygt 3 gånger (vid dynamisk temperaturstyrning snabbare vid högre temperaturregim jämfört med lagring vid 4 °C (tid för fördubbling i 8 °C: 5,42 h, och med dynamisk temperaturstyrning: 4,39 h). En intressant observation i detta sammanhang är att den dynamiska temperaturstyrningen påskyndade tillväxt av *L. monocytogenes* jämfört med den kontinuerliga behandlingen vid 8 °C.



Figur 6 Förekomst av *L. monocytogenes* (A) och heterotrofa bakterier (B) (Log CFU g frukt⁻¹) vid lagring i åtta dagar vid 4 °C (grön), 8 °C (lila) respektive 4 °C under dag 1 och 8 °C under den resterande tiden (orange). Olika bokstäver över staplarna indikerar signifikanta skillnader enligt Anova och general linear model ($p < 0.05$).

Tabell 4 Tillväxtparametrar för *L. monocytogenes* och heterotrofa bakterier i skurna färsk fruktcocktail vid lagring under 8 dagar vid 4 °C, 8 °C respektive i med dynamisk temperaturstyrning (dag 1: 4 °C; övriga dagar: 8 °C). Ekvationerna som ligger till grund till beräkning av de olika parametrarna redovisas under avsnitt "Beräkningar" i kapitel 4.

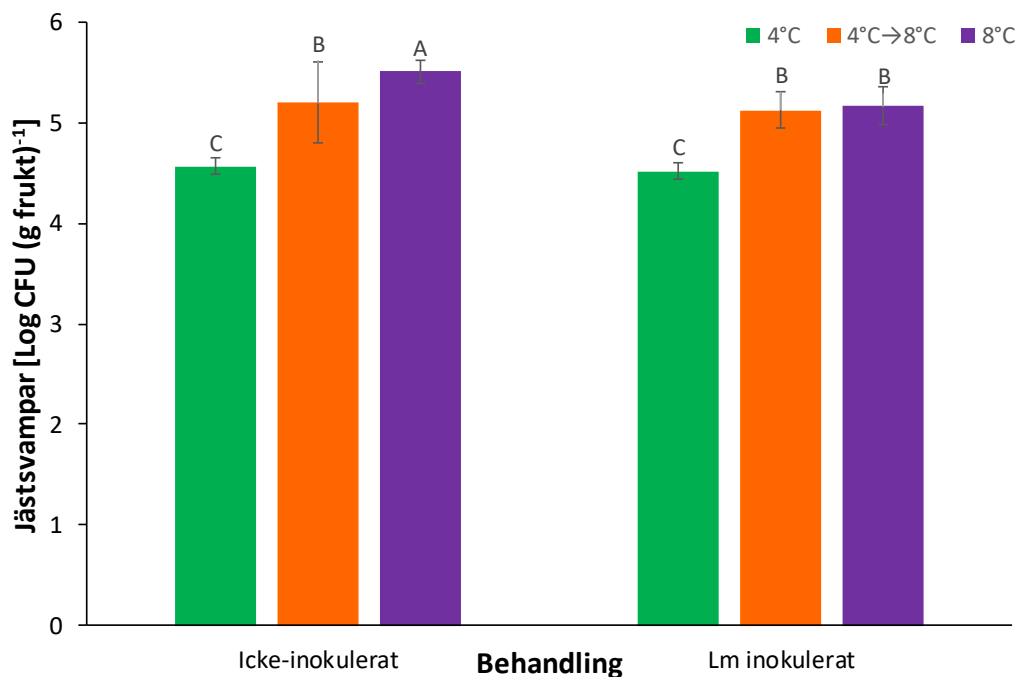
	Antal generationer (n)	Generations-tid (g) ¹	Specifik tillväxtkvot	Delningskvot
<i>Listeria monocytogenes</i>				
4°C	1,96	10,20	0,03	0,10
4°C→8°C	4,55	4,39	0,07	0,23
8°C	3,69	5,42	0,06	0,18
Heterotrofa bakterier (i icke inokulerade fruktcocktail)				
4°C	9,5	2,11	0,14	0,48
4°C→8°C	14,28	1,40	0,22	0,71
8°C	13,15	1,52	0,20	0,66
Heterotrofa bakterier (i inokulerade fruktcocktail)				
4°C	8,21	2,44	0,12	0,41
4°C→8°C	12,79	1,56	0,19	0,64
8°C	13,22	1,51	0,20	0,66

2.2.3. Tillväxt av övriga mikroorganismer i färsk fruktsallader vid olika temperaturregimer

Heterotrofa bakterier analyserades enbart dag 0 (direkt efter försöksstart) och dag 8 (vid försöksslut) i både inokulerade och oinokulerade fruktsallader (Figur 6B). En markant tillväxt av heterotrofa bakterier kunde påvisas i samtliga behandlingar (Figur 6B, Tabell 4). Tillväxten var signifikant lägre i fruktsallad som lagrats vid 4 °C jämfört med sallader som utsatts för 8 °C och den dynamiska temperaturregimen. Förekomsten av heterotrofa var något lägre i fruktsallader som inokulerats med *L. monocytogenes*, dock inte signifikant lägre. Också för heterotrofa bakterier behövdes kortare tid för fördubbling när fruktsallader förvarades vid 8 °C jämfört med kontinuerlig behandling vid 4 °C. Skillnaden var inte lika påfallande som för *L. monocytogenes*. Förökningstakten var långsammare i närvaro av *L. monocytogenes*.

Från och med dag 5 iaktogs gasutveckling i de fruktförpackningarna som lagrades vid högre temperaturer (både behandling 2 och 3). Den tilltog mot slutet av försöksperioden. Fruktsalladsförpackningarna som ingick i behandling 2 och 3 antog en alltmer buktande form. Från och med dag 6 avgav dessa förpackningar också en mycket distinkt jästlukt, som kändes dag 6 efter att förpackningarna hade öppnats och vid senare tillfällen även från de öppnade paketen.

Förekomst av jästsvampar analyserades därför *ad hoc* dag 8 och resultaten redovisas i Figur 7. Signifikanta skillnader i förekomsten av jästsvampar fastställdes mellan fruktsallader som lagrats kontinuerligt vid 4 °C och de andra två temperaturregimerna. Förekomsten av jästsvampar var högst då fruktsallader hade lagrats kontinuerligt vid 8 °C. Signifikanta skillnader mellan den dynamiska och kontinuerliga 8 °C behandling kunde enbart noteras i fruktsallader fria från *L. monocytogenes*. Då halten jästsvampar jämfördes mellan fruktsallader med och utan tillsats av *L. monocytogenes* noterades vi något högre halter i närvaro av *Listeria*. Dessa skillnader var dock inte signifikanta.



Figur 7 Förekomst av jästsvampar i fruktsallad som lagrats i åtta dagar vid 4 °C, 8 °C eller med dynamisk temperaturstyrning (dag 1: 4 °C; dag 2-8: 8 °C). Cocktailen hade efter packning inokulerats med *L. monocytogenes*. Olika bokstäver över staplarna indikerar signifikanta skillnader enligt Anova och general linear model ($p < 0.05$).

2.2.4. Abiotiska faktorer

Abiotiska faktorer (pH, vattenaktivitet, total aciditet och refraktometrisk torrsubstans) väsentliga för tillväxt av *L. monocytogenes* redovisas i Tabell 5. Inga signifikanta skillnader konstateras för pH och vattenaktivitet för någon av kylbehandlingar mellan de två avläsningstidpunkterna. Värdena för refraktometrisk torrsubstans sjönk i samtliga behandlingar mellan försökstart och –slut, men signifikanta skillnader konstaterades enbart vid en konstant eller dynamisk lagringstemperatur på 8 °C.

Tabell 5 Abiotiska faktorer i fruktcocktails vid studiens start (dag 0) och slut (dag 8). Skurna färska fruktcocktails förvarades kontinuerligt vid 4 °C respektive 8 °C i åtta dagar, eller i dynamisk temperaturstyrning med 4 °C under dag 1 och 8 °C under de resterande sju dagarna. Värden inom samma rad och lagringstemperatur som åtföljs av olika bokstäver skiljer signifikant enligt envägs-Anova och Tukey-test ($p < 0.05$).

	4°C		4°C→8°C		8°C	
	Dag 0	Dag 8	Dag 0	Dag 8	Dag 0	Dag 8
pH	3,85A	3,91A	3,89A	3,95A	3,96A	3,92A
Vattenaktivitet (aw)	0,982 A	0,985A	0,980A	0,980 A	0,980A	0,980A
Total aciditet (%)	0,56A	0,54A	0,55B	0,63A	0,60A	0,62A
Refaktrometrisk torrsubstans (%)	14.14A	13,70A	14,09A	13,26B	14,46A	13,70B

3. Diskussion och slutsatser

Lagringstemperaturerna för fruktsallader i föreliggande försök var låga men avsevärt högre än minimitemperaturen för tillväxt av *L. monocytogenes*. Nivåerna för vattenaktivitet låg nära tillväxtoptimum, medan pH betingelserna var suboptimala. Trots detta fanns en viss tillväxt av *L. monocytogenes* i samtliga behandlingar; de var signifikanta för prover som utsattes för en kontinuerlig eller dynamisk temperaturbehandling vid 8 °C. En kontinuerlig lagringstemperatur vid 4 °C kan säkerställa en tillfredsställande produkt med <100 CFU *L. monocytogenes*/g fruktcocktail om utgångsvärdet på *L. monocytogenes* inte överskrider 25 CFU/g fruktsallad. Likaså kommer detta gränsvärde redan nås efter drygt 83 h (3 dagar och 11 h) lagring i 8 °C, om utgångsvärdet är 25 CFU/g fruktcocktail. Detta skulle innebära att livsmedelssäkerheten för produkten är otillfredsställande redan för utgång av hållbarhetstiden på 4 dagar.

Föreliggande studie har genomförts med ett begränsat antal upprepningar. Därför bör man inte dra förhastade slutsatser över lämpligheten av högre lagringstemperaturer än de rekommenderade 4 °C. Studien bör upprepas två gånger med samma stam av *L. monocytogenes*. För att kunna göra en riskanalys bör hela studien upprepas med flera kliniska stammar.

Att utöka lagringstemperaturen och lagringstiden från 4 °C till 8 °C och 4 till 8 dagar är dock olämpligt ur ett annat perspektiv – nämligen på grund av den avsevärda tillväxten av jästsvampar. Både doften av jäst samt den stora gasutvecklingen i fruktförpackningarna är inte attraktiva för slutkonsumenten.

De abiotiska betingelserna i fruktcocktailen kommer att förändras om en eller flera andra fruktslag ingår. Detta stöds också av observationer av Ziegler et al. (2018) och innebär att det kommer krävas nya provokationsförsök med flera stammar av *L. monocytogenes* och ett flertal upprepningar.

För färsk skuren melon presenterades två tillväxtmodeller för *L. monocytogenes* med temperatur som avgörande faktor (Danyluk et al., 2014, Fang et al., 2013). Fang et al. (2013) förordade sin tillväxtmodell också för att optimering av lagringstemperatur och –längd samt som ett verktyg för riskbedömning för myndigheter och beredningsföretag. Trots den goda passningen för dessa två modeller är det viktigt att inte dra förhastade slutsatser vad gäller andra frukt eller fruktcocktails. De flesta studier har genomförts med individuella fruktslag. Däremot finns få studier som redovisar tillväxthastigheten

av *Listeria* spp. i blandningar av färskskurna frukt. Föreliggande data från litteraturen och från denna rapports experimentella del tyder på att samspelet i fruktcocktails är mycket mer komplext och att även andra faktorer behöver tas hänsyn till, t.ex. fruktens mognadsgrad och pH i fruktblandningen. Våra resultat visar att *L. monocytogenes* visade på tillväxtpotential trots att pH i blandningen var lägre än det minimi-pH redovisat i litteraturen (Beaufort et al., 2014).

Internationellt har det beskrivits en rad olika behandlingar som kan förlänga hållbarheten (*shelf-life*) av skurna frukter genom tillsatser under tvättprocessen, behandlingar efter tvätten samt val av förpackning (Corbo et al., 2015, Gorny, 2001, Iturralde-Garcia et al., 2022, Siddiqui, 2020, Vivek et al., 2019). Alla dessa behandlingar är inte tillåtna i EU eller Sverige. I detta sammanhang är det också viktigt att ta in konsumenternas attityd till eventuella åtgärder och vad som uppfattas som ett avsteg från konsumentens förväntningar av en hälsosam produkt.

Utifrån föreliggande resultat drar vi slutsatsen att bibehålla den rekommenderade lagringstemperaturen av 4 °C. Om man vill utöka lagringstiden till 8 dagar är det viktigt att kunna garantera att *L. monocytogenes* inte överskrider en slutkoncentration (hos konsumenten) på <100 CFU/g färsk fruktsallad.

4. Material och metoder

Studien genomfördes i form av en litteraturstudie och en experimentell provokationsstudie.

4.1. Litteraturstudie

Litteratur extraherades från systematiska litteratursökningar i databasen "Web of Science". Referenserna identifierades i tre oberoende sökningar och urvalet följde processen för systematiska litteratursökningar enligt PRISMA (Moher et al., 2009).

Färska fruktsallader, temperatur, livsmedelssäkerhet och hållbarhet användes som nyckelkoncept. Den psykrofila organismen *Listeria monocytogenes* användes som målorganism, därför att den förekommer på frukt som används i färska fruktsallader och i tillverkningsmiljön, kan föröka sig vid låga temperaturer (0-1 °C) och eftersom den har upprepat identifierats som källa bakom utbrott av magsjukor relaterade till konsumtion av frukt och grönt. Sökningarna redovisas i Tabell 6. Följande generella kriterier användes för inkluderande respektive exkluderande av referenser i enlighet med Alsanius et al. (2022):

- Inkluderande:

Originalartiklar i vetenskapliga tidskrifter där artikeln genomgått "peer-review" process och som

- 1) Omfattar minst en söktermskombination
- 2) Adresserar nyckelkoncept resp.
- 3) målorganismen

Artiklar skrivna på engelska, tyska, franska eller skandinaviska språk beaktades.

- Exkluderande:

Publikationer exkluderas om dessa inte

- 1) adresserar nyckelkoncepten
- 2) är originalartiklar (t.ex. översiktsartiklar)
- 3) innehåller tillräckligt evidens.

För högrelevanta äldre referenser spårades också litteratur framåt i tiden. Dessa artiklar inkluderades enbart om de mötte de ovannämnda kriterierna för inkluderande och exkluderande.

Tabell 6 Koncept och söktermer samt antal träffar i Web of Science sökningarna

Koncept 1	Koncept 2	Antal träffar
"Listeria monocytogenes" AND ("fresh cut fruit cocktail" OR "fresh cut fruit" OR "Minimally preserved fruit" OR "Minimally processed fruit" OR "fruit product")	"shelf life" ("storage temperature" OR "temperature") "storage length"	47
		26
		0

Överlappningar togs bort och 54 artiklar ingick i den systematiska litteraturgenomgången. Ytterligare referenser identifierades genom litteraturspårningar bakåt och framåt i tiden.

Litteraturstudien redovisas i kapitel 2.1.

4.2. Provokationsstudie

4.2.1. Förundersökning

En klinisk stam av *L. monocytogenes* användes. För att kunna återisolera den introducerade stammen och för att kunna skilja ut den från eventuellt förekommande bakgrundskontaminering markerades stammen genom spontan mutation. Den ommarkerade och markerade stammen jämfördes med hänsyn till deras tillväxtmönster.

Stammen odlades upp vid 30 °C i 24 h, följd av uppförökning vid låg temperatur i 8 °C under 36 h i Trypton Soja Buljong (TSB). Cellkulturen tvättades genom upprepad centrifugering och resuspendering av pelletten i en 0,85%-ig koksaltlösning. Stamlösningens densitet ställdes till en optisk densitet av OD₆₂₀ 0.320 och förtunnades sedan med hänsyn till den förväntade fruktvikten i lådorna (175 g).

4.2.2. Genomförande

En ml av inokulationsvätskan sprutades in i vardera av de totalt 126 förpackningar med fruktcocktail utan att bryta förpackningarna och förändra atmosfären inom förpackningarna. Som en kontroll inokulerades tolv förpackningar endast med

steril koksaltlösning som sedan analyserades dag 0 och dag 8. Inneslutna fruktförpackningar placerades i 4 °C resp. 8 °C och förvarades i åtta dagar.

Undersökningen genomfördes med tre temperaturregimer:

- Behandling 1: 4 °C i åtta dagar,
- Behandling 2: 8 °C i åtta dagar samt
- Behandling 3: 4 °C i ett dygn följt av 8 °C under återstående lagringstid på totalt åtta dagar (dynamisk temperaturregim).

4.2.3. Analys och beräkning

Schemat för provtagningarna redovisas i Tabell 7.

Vid analysen delades fruktcocktailen från varje låda upp för mikrobiologisk analys, analys av vattenaktivitet samt biokemisk analys. Kontrollerna analyserades enbart dag 0 och dag 8. Av försökstekniska skäl (smittskydd) bestämdes pH enbart dag 0 och dag 8 i frukt som tagits ur försöksleden.

Tabell 7 Provtagnings-schemat vid provokation med *Listeria monocytogenes*

	Dagar efter inokulation						
	0	3	4	5	6	7	8
<i>Listeria monocytogenes</i> *	•	•	•	•	•	•	•
Generell mikrobiota*	•						•
pH	•						•
Vattenaktivitet	•	•	•	•	•	•	•

Mikrobiologisk analys. För den mikrobiologiska analysen vägdes 25 g fruktcocktail in i filterpåsar och homogeniserades med hjälp av en stomacher i 1 min vid hög hastighet (steg 3). Proverna sedimenterade i 2 min. All vätska som filtrerats genom filterpåsens membran överfördes sedan i individuella provrör och centrifugerades vid 3200 rpm i 10 min vid 4 °C. Supernatanten förkastades medan pelleten resuspenderades i 1 ml TRIS buffert. Materialet användes för att sätta upp spädningsserier. Levande celltal (colony-forming unit, CFU) av *Listeria monocytogenes* analyserades på selektiv agar (Harlequin™ *Listeria* Chromogenic Agar). Den generella mikrobiotan analyserades på TSB försatt med 1,5% Bacto Agar. *Ad hoc* analyserades också förekomsten av jästsvampar på jäst-malt-agar. Inkubationstemperatur och –längd redovisas i Tabell 8. Proverna analyserades med tre replikat per fruktcocktail.

Tabell 8 Inkubationsbetingelser (temperatur, °C; längd, h) för de heterotrofa bakterier (Trypton Soja Agar), *Listeria monocytogenes* (Harlequin Agar) och jästsvampar (Jäst-malt-agar).

Mikrobiologiskt medium	Inkubations-	
	temperatur	längd
Trypton Soja Agar	25	48
Harlequin agar	37	24
Jäst-malt-agar	25	72

Vattenaktivitet. Vattenaktivitet mättes med hjälp av AquaLab Pre (Meter Group, Pullman, WA, USA) och vattenaktivitet, temperatur och dagpunkt registrerades. Instrumentet kalibrerades inför första analys för analysdagen samt efter var 10:e prov mot två relevanta standarder (0,984; 1.000).,

Biokemisk analys. Analys av pH, total aciditet och refraktometrisk torrs substans analyserades enligt Ali et al. (2012).

Beräkning. Resultat på CFU justerades med hänsyn till vikt och log-transformerades ($\log_{10} + 1$). Medeltalet från varje fruktcocktail användes för den statistiska analysen. Tillväxtparametrarna beräknades enligt ekvationer 1-5, nämligen för

- Antal generationer (n)

$$N = N_0 2^n$$
 (ekvation 1)
Där N står för det slutliga antalet bakterier, N_0 för det initiella antalet bakterier och n för antal generationer.
- Generationstid (g)

$$g = \frac{t}{n}$$
 (ekvation 2)
Där g står för det generationstid, t för tidspannet (h) och n för antal generationer.
- Specifik tillväxtkvot (k)

$$k = 0.301 \times \frac{t}{n} = \frac{0.301}{g}$$
 (ekvation 3)
Där g står för det generationstid, t för tidspannet (h) och n för antal generationer samt k för den specifika tillväxtkvoten, som motsvarar kurvans lutning.
- Delningskvot (v)

$$v = \frac{1}{g}$$
 (ekvation 4)

Där v står för det delningskvoten och t för tidspannet (h).

- Tillväxtpotential (δ)

$$\delta = \log N - \log N_0 \text{ (ekvation 5)}$$

Där N står för det slutliga antalet bakterier (log CFU/g), N_0 för det initiella antalet bakterier (log CFU/g).

Resultaten analyserades statistiskt med hjälp av Anova (general linear model respektive envägs-Anova) följt av Tukey test ($p < 0.05$).

Provokationsstudien redovisas i kapitel 2.2.

Referenser

- ABEYSUNDARA, P. D. A., DHOWLAGHAR, N., NANNAPANENI, R., SCHILLING, M. W., CHANG, S., MAHMOUD, B.-., SHARMA, C. S. & MA, D.-P. 2017. Growth and biofilm formation by *Listeria monocytogenes* in cantaloupe flesh and peel extracts on four food-contact surfaces at 22 °C and 10 °C. *Food Control*, 80, 131-142. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.04.043.
- ALEGRE, I., VINAS, I., USALL, J., TEIXIDO, N., FIGGE, M. J. & ABADIAS, M. 2013. Control of foodborne pathogens on fresh-cut fruit by a novel strain of *Pseudomonas graminis*. *Food Microbiology*, 34, 390-399. doi: 10.1016/j.fm.2013.01.013.
- ALI, L., ALSANIUS, B. W., ROSBERG, A. K., SVENSSON, B., NIELSEN, T. & OLSSON, M. 2012. Effects of nutrition strategy on the levels of nutrients and bioactive compounds in blackberries. *European Journal of Food Research and Technology*, 234, 33-44.
- ALSANIUS, B. W., NICOLAIDIS LINDQVIST, A. & VÅGSHOLM, I. 2022. Green wheel – om målkonflikten rörande tunga batteridrivna vägtransporter och mikrobiella faror samt hållbarhet av bladgrönsaker. In: FACULTY, L. (ed.) *Landskapsarkitektur Trädgård Växtproduktionsvetenskap - Rapportserie*. Alnarp: Dept of Biosystems and Technology.
- ALTHAUS, D., HOFER, E., CORTI, S., JULMI, A. & STEPHAN, R. 2012. Bacteriological survey of ready-to-eat lettuce, fresh-cut fruit, and sprouts collected from the Swiss market. *Journal of Food Protection*, 75, 1338-1341. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-022.
- AMARO, A. L., SPADAFORA, N. D., PEREIRA, M. J., DHORAJIWALA, R., HERBERT, R. J., MÜLLER, C. T., ROGERS, H. J. & PINTADO, M. 2018. Multitrait analysis of fresh-cut cantaloupe melon enables discrimination between storage times and temperatures and identifies potential markers for quality assessments. *Food Chemistry*, 241, 222-231. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.050.
- BEAUFORT, A., BERGIS, H., LARDEUX, A., POLET, M., BOTTELDOORN, N., PAPAGEORGIOU, G., ANDERSEN, J., BOEL, J., HICKEY, B. & PRENCIPE, V. 2014. Technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods; EURL Lm Technical Guidance Document; European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes*. 2014.

- BRUGÅRD KONDE, Å., BJERSELIUS, R., HAGLUND, L., JANSSON, A., PEARSON, M., SANNER FÄRNSTRAND, J. & JOHANSSON, A.-K. 2015. Råd om bra matvanor - risk- och nyttohanteringsrapport. *Rapport*. Uppsala: Livsmedelsverket.
- CARSTENS, C. K., SALAZAR, J. K. & DARKOH, C. 2019. Multistate outbreaks of foodborne illness in the United States associated with fresh produce from 2010 to 2017. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2667. doi: 10.3389/fmicb.2019.02667.
- CHEN, L., PAN, Y., LI, H., LIU, Z., JIA, X., LI, W., JIA, H. & LI, X. 2020. Constant temperature during postharvest storage delays fruit ripening and enhances the antioxidant capacity of mature green tomato. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44, e14831. doi: 10.1111/jfpp.14831.
- COLÁS-MEDÀ, P., ABADIAS, M., ALEGRE, I., USALL, J. & VIÑAS, I. 2015. Effect of ripeness stage during processing on *Listeria monocytogenes* growth on fresh-cut 'Conference' pears. *Food Microbiology*, 49, 116-122. doi: 10.1016/j.fm.2015.01.019.
- CORBO, M., CAMPANIELLO, D., SPERANZA, B., BEVILACQUA, A. & SINIGAGLIA, M. 2015. Non-conventional tools to preserve and prolong the quality of minimally-processed fruits and vegetables. *Coatings*, 5, 931-961. doi: 10.3390/coatings5040931.
- DANYLUK, M. D., FRIEDRICH, L. M. & SCHAFFNER, D. W. 2014. Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* on cut cantaloupe, honeydew and watermelon. *Food Microbiology*, 38, 52-55. doi: 10.1016/j.fm.2013.08.001.
- DI BONAVENTURA, G., PICCOLOMINI, R., PALUDI, D., D'ORIO, V., VERGARA, A., CONTER, M. & IANIERI, A. 2008. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1552-1561. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03688.x.
- EFSA BIOHAZ PANEL, RICCI, A., ALLENDE, A., BOLTON, D., CHEMALY, M., DAVIES, R., FERNÁNDEZ ESCÁMEZ, P. S., GIRONES, R., HERMAN, L., KOUTSOUMANIS, K., NØRRUNG, B., ROBERTSON, L., RU, G., SANAA, M., SIMMONS, M., SKANDAMIS, P., SNARY, E., SPEYBROECK, N., TER KUILE, B., THRELFALL, J., WAHLSTRÖM, H., TAKKINEN, J., WAGNER, M., ARCELLA, D., DA SILVA FELICIO, M. T., GEORGIADIS, M., MESSENS, W. & LINDQVIST, R. 2018. *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA Journal*, 16. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5134.
- FANG, T., LIU, Y. & HUANG, L. 2013. Growth kinetics of *Listeria monocytogenes* and spoilage microorganisms in fresh-cut cantaloupe. *Food Microbiology*, 34, 174-81. doi: 10.1016/j.fm.2012.12.005.
- FERRANTE, A. & MAGGIORE, T. 2007. Chlorophyll a fluorescence measurements to evaluate storage time and temperature of Valeriana leafy vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 45, 73-80. doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.02.003.

- FRANCIS, G. A., GALLONE, A., NYCHAS, G. J., SOFOS, J. N., COLELLI, G., AMODIO, M. L. & SPANO, G. 2012. Factors affecting quality and safety of fresh-cut produce. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 595-610. doi: 10.1080/10408398.2010.503685.
- GIANNAKOUROU, M. C. & TSIRONI, T. N. 2021. Application of processing and packaging hurdles for fresh-cut fruits and vegetables preservation. *Foods*, 10, 830. doi: 10.3390/foods10040830.
- GIL, M. I., AGUAYO, E. & KADER, A. A. 2006. Quality changes and nutrient retention in fresh-cut versus whole fruits during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4284-4296. doi: 10.1021/jf060303y.
- GORNY, J. R. 2001. A summary of CA and MA requirements and recommendations for fresh-cut (minimally processed) fruits and vegetables. *Acta Horticulturae*, 600, 609-614. doi: 10.17660/ActaHortic.2003.600.92.
- GORNY, J. R., CIFUENTES, R. A., HESS-PIERCE, B. & KADER, A. A. 2000. Quality changes in fresh-cut pear slices as affected by cultivar, ripeness stage, fruit size, and storage regime. *Journal of Food Science*, 65, 541-544. doi: 10.1111/j.1365-2621.2000.tb16044.x.
- GORNY, J. R., HESS-PIERCE, B. & KADER, A. A. 1998. Effects of fruit ripeness and storage temperature on the deterioration rate of fresh-cut peach and nectarine slices. *HortScience*, 33, 110-113.
- GORNY, J. R., HESS-PIERCE, B. & KADER, A. A. 1999. Quality changes in fresh-cut peach and nectarine slices as affected by cultivar, storage atmosphere and chemical treatments. *Journal of Food Science*, 64, 429-432. doi: 10.1111/j.1365-2621.1999.tb15057.x.
- GROSS, K. C., WANG, C. Y. & SALTVEIT, M. 2016. *The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stock*, Washington, DC., Department of Agriculture, Agricultural Research Service.
- HUANG, J., LUO, Y., ZHOU, B., ZHENG, J. & NOU, X. 2019. Growth and survival of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce and their juice extracts: Impacts and interactions of food matrices and temperature abuse conditions. *Food Control*, 100, 300-304. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.12.035.
- ITURRALDE-GARCIA, D., CINCO-MOROYOQUI, R. X., MARTINEZ-CRUZ, F., RUIZ-CRUZ, O., WONG-CORRAL, S., BORBOA-FLORES, F. J., CORNEJO-RAMIREZ, J. I., BERNAL-MERCADO, Y. T. & DEL-TORO-SANCHEZ, A. L. 2022. Emerging Technologies for Prolonging Fresh-Cut Fruits' Quality and Safety during Storage. *Horticulturae*, 8. doi: 10.3390/horticulturae8080731.
- ITURRALDE-GARCÍA, R. D., CINCO-MOROYOQUI, F. J., MARTÍNEZ-CRUZ, O., RUIZ-CRUZ, S., WONG-CORRAL, F. J., BORBOA-FLORES, J., CORNEJO-RAMÍREZ, Y. I., BERNAL-MERCADO, A. T. & DEL-TORO-SÁNCHEZ, C. L. 2022. Emerging Technologies for Prolonging Fresh-Cut Fruits' Quality and Safety during Storage. *Horticulturae*, 8, 731. doi: 10.3390/horticulturae8080731.
- KROFT, B., GU, G., BOLTEN, S., MICALLEF, S. A., LUO, Y., MILLNER, P. & NOU, X. 2022. Effects of temperature abuse on the growth and survival of *Listeria monocytogenes* on a wide variety of whole and fresh-cut fruits and

- vegetables during storage. *Food Control*, 137. doi: 10.1016/j.foodcont.2022.108919.
- MCCOLLUM, J. T., CRONQUIST, A. B., SILK, B. J., JACKSON, K. A., O'CONNOR, K. A., COSGROVE, S., GOSSACK, J. P., PARACHINI, S. S., JAIN, N. S., ETTESTAD, P., IBRAHEEM, M., CANTU, V., JOSHI, M., DUVERNOY, T., FOGG, N. W., GORNY, J. R., MOGEN, K. M., SPIRES, C., TEITELL, P., JOSEPH, L. A., TARR, C. L., IMANISHI, M., NEIL, K. P., TAUXE, R. V. & MAHON, B. E. 2013. Multistate outbreak of listeriosis associated with cantaloupe. *New England Journal of Medicine*, 369, 944-953. doi: 10.1056/nejmoa1215837.
- MOHER, D., LIBERATI, A., TETZLAFF, J., ALTMAN, D. G. & THE PRISMA GROUP 2009. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *PLoS Med*, 6, e1000097. doi: 10.1371/journal.pmed1000097.
- MULAOSMANOVIC, E., WINDSTAM, S., VÅGSHOLM, I. & ALSANIUS, B. W. 2021. Size matters: Biological and food safety relevance of leaf damage for colonization of *Escherichia coli* O157:H7gfp+. *Frontiers in Microbiology*, 11, 608086. doi: 10.3389/fmicb.2020.608086.
- SALAZAR, J. K., CARSTENS, C. K., BATHIJA, V. M., NARULA, S. S., PARISH, M. & TORTORELLO, M. L. 2016. Fate of *Listeria monocytogenes* in fresh apples and caramel apples. *Journal of Food Protection*, 79, 696-702. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-15-442.
- SIDDIQUI, M. W. 2020. *Technologies and mechanisms for safety control: fresh-cut fruits and vegetables*, London, San Diego, Cambridge, Oxford, Elsevier, Academic Press.
- SOLIVA-FORTUNY, R. C. & MARTÍN-BELLOSO, O. 2003. New advances in extending the shelf-life of fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 14, 341-353. doi: 10.1016/S0924-2244(03)00054-2.
- TAN, X., CHUNG, T., CHEN, Y., MACARISIN, D., LABORDE, L. & KOVAC, J. 2019. The occurrence of *Listeria monocytogenes* is associated with built environment microbiota in three tree fruit processing facilities. *Microbiome*, 7. doi: 10.1186/s40168-019-0726-2.
- VIVEK, K., SURANJOY SINGH, S., W, R., M, S., Z, B., H, B., S, M. & R.C, P. 2019. A review on postharvest management and advances in the minimal processing of fresh-cut fruits and vegetables *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 8, 1178-1187. doi: 10.15414/jmbfs.2019.8.5.1178-1187.
- WIDEMAN, N. E., OLIVER, J. D., CRANDALL, P. G. & JARVIS, N. A. 2021. Detection and potential virulence of viable but non-culturable (VBNC) *Listeria monocytogenes*: A review. *Microorganisms*, 9, 194. doi: 10.3390/microorganisms9010194.
- WING, E. J. & GREGORY, S. H. 2002. *Listeria monocytogenes*: Clinical and experimental update. *Journal of Infectious Diseases*, 185, S18–S24. doi: 10.1086/338465.

- ZHANG, H., YAMAMOTO, E., MURPHY, J. & LOCAS, A. 2020. Microbiological safety of ready-to-eat fresh-cut fruits and vegetables sold on the Canadian retail market. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108855.
- ZIEGLER, M., RÜEGG, S., STEPHAN, R. & GULDIMANN, C. 2018. Growth potential of *Listeria monocytogenes* in six different RTE fruit products: impact of food matrix, storage temperature and shelf life. *Italian Journal of Food Safety*, 7. doi: 10.4081/ijfs.2018.7581.

