



# Linnéuniversitetet

Institutionen för naturvetenskap

Examensarbete

Analys av vitamin B<sub>12</sub> i tillagad  
och återuppvärmd lax genom bioassay  
med *Lactobacillus delbrueckii*  
subart *lactis* ATCC<sup>®</sup> 7830<sup>™</sup>

Ellen Edgren  
Ämne: kemi  
Nivå: D

# Analys av vitamin B<sub>12</sub> i tillagad och återuppvärmd lax genom bioassay med *Lactobacillus delbrueckii* subart *lactis* ATCC<sup>®</sup> 7830<sup>TM</sup>

*Ellen Edgren*

**Nutrition och livsmedelsvetenskap, 240 högskolepoäng**

Institutionen för naturvetenskap, Linnéuniversitetet, Kalmar  
Examensarbete 30 högskolepoäng

**Handledare:**

**Irene Mattisson, Dr. med.vet.**

Livsmedelsverket  
Box 622  
751 26 UPPSALA

**Anna Blücher, Tekn.lic.**

Institutionen för naturvetenskap  
Linnéuniversitetet, Kalmar  
391 82 KALMAR

**Examinator:**

**Kjell Edman, Ph.D.**

Institutionen för naturvetenskap  
Linnéuniversitetet, Kalmar  
391 82 KALMAR

## **SAMMANFATTNING**

Halten näringsämnen i livsmedel varierar bland annat med tillagningsmetod, lagringstid och lagringsförhållanden, som exponering för ljus och syre. Oklarheter finns för mikrovgors inverkan på näringsämnen och framförallt på vitamin B<sub>12</sub>. Eftersom många äldre drabbas av brist på vitamin B<sub>12</sub>, är detta av intresse eftersom många hemmaboende äldre människor får hemleverans av färdiga matportioner som är avsedda att värmas, ofta i mikrovgåsgugn. Syftet med studien var att kunna ge en indikation på om uppvärmning genom mikrovgor påverkar halten vitamin B<sub>12</sub> i färdiga kylda måltider. Detta gjordes genom litteratursammanställning om vitamin B<sub>12</sub> och mikrovgor samt genom bioassay med *Lactobacillus delbrueckii*. Vitamin B<sub>12</sub> i ouppvärmad lax, lax värmd i mikrovgåsgugn samt lax värmd i konventionell ugn analyserades. Tillväxten av bakterier uppskattades genom mätning av turbiditet. Högst vitamin B<sub>12</sub>-halt sågs i mikrovgåsvärmd lax, därefter ouppvärmad lax och ugnsvärmd lax. Statistiskt signifikanta skillnader sågs för analyserade vitamin B<sub>12</sub>-halter mellan ouppvärmad- och ugnsvärmd prov respektive mellan mikrovgåsvärmd- och ugnsvärmd prov. De varierande vitaminhalterna kan bero på metodfel, otillräcklig vitaminextraktion eller att bakterierna inte konsumerat allt tillgängligt vitamin vid turbiditetsmätning. Slutsatsen av studien är att halten vitamin B<sub>12</sub> i livsmedel inte verkar påverkas negativt av mikrovgor, däremot finns tendenser att halten minskar beroende av temperatur och tillagningstid.

## ABSTRACT

The amount of nutrients in foods differs due to differences in cooking, time of storage and storage conditions, such as exposure of light and oxygen. Microwaves impact on nutrients and on vitamin B<sub>12</sub> is not well defined. Vitamin B<sub>12</sub> is a critical vitamin in the elderly. It is of large interest since many home living elderly today gets home delivery of meals, which are meant to heat up in the microwave oven. The aim of this study was to try to indicate whether heating through microwaves affect the amount of vitamin B<sub>12</sub> in ready-cooked foods. This was made through literature research about vitamin B<sub>12</sub> and microwaves, and through bioassay with *Lactobacillus delbrueckii*. Vitamin B<sub>12</sub> was analyzed in salmon; unheated, heated in microwave oven and in conventional oven. The highest amount of vitamin was analyzed in the salmon which was heated by microwaves, subsequently unheated salmon and conventional heated. The analyzed amount of vitamin B<sub>12</sub> is statistical significant between unheated- and conventional heated salmon respectively microwave heated and conventional heated salmon. The varying analyzed amount of the vitamin can be due to method error, insufficient vitamin extraction or the fact that the bacteria did not have consumed all available vitamin B<sub>12</sub> when the turbidity was measured. The conclusion of this study is that the amounts of vitamin B<sub>12</sub> in food do not tend to be affected negatively by microwaves. It rather tends to decrease due to temperature and time of cooking.

## **PROLOG**

Examensarbetet omfattar 30 högskolepoäng och har utförts under 20 veckors heltidsstudier, vårterminen 2010. Examensarbetet är del i magisterprogrammet; Nutrition och livsmedelsvetenskap, 240hp, Linnéuniversitetet i Kalmar.

Examensarbetet har gjorts för Sveriges Livsmedelsverk i samverkan med Linnéuniversitetet i Kalmar. På Livsmedelsverket har litteratursammanställning samt resultat och statistikbearbetning gjorts, medan mikrobiologiska analyser genomförts vid Linnéuniversitetet.

Jag vill tacka min handledare, Irene Mattisson på Livsmedelverket för enormt stöd och bra handledning under arbetets gång.

Jag vill också tacka Veronica Öhrvik, och övriga medarbetare på nutritionsavdelningen, Livsmedelsverket.

Stort tack vill jag även ge till min nära vän och programkamrat, Sofia Skott för korrekturläsning samt för gediget stöttande under terminens 20 veckor.

Jag vill tacka Nina Andersson-Junkka, Linnéuniversitetet.

Avslutningsvis tackar jag min handledare Anna Blücher på Linnéuniversitetet för bra handledning och korrekturläsning.

**Uppsala, maj 2010**

*Ellen Edgren*

# INNEHÅLLSFÖRTECKNING

<b>1. INTRODUKTION</b> .....	<b>3</b>
<b>2. SYFTE</b> .....	<b>3</b>
<b>3. BAKGRUND</b> .....	<b>3</b>
3.1 VITAMIN B <sub>12</sub> .....	3
3.1.1 Kemisk struktur .....	3
3.1.2 Stabilitet .....	5
3.1.3 Funktion .....	5
3.1.4 Absorption .....	6
3.1.5 Behov och rekommendationer .....	8
3.1.6 Brist av vitamin B <sub>12</sub> .....	9
3.1.7 Brist hos äldre .....	10
3.2 MIKROVÅGOR .....	11
3.2.1 Funktion .....	11
3.2.2 Kemiska användningsområden för mikrovågor .....	13
3.3 ANALYS AV VITAMIN B <sub>12</sub> .....	14
3.3.1 Tillväxt av bakterier .....	14
3.3.2 Bioassay .....	15
3.3.3 <i>Lactobacillus delbrueckii subart lactis ATCC<sup>®</sup> 7830<sup>TM</sup></i> .....	16
3.3.4 Provextraktion .....	16
<b>4. MATERIAL OCH METOD</b> .....	<b>17</b>
4.1 TORRVIKTSBESTÄMNING .....	17
4.2 HALTBESTÄMNING AV LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBART LACTIS ATCC <sup>®</sup> 7830 <sup>TM</sup> .....	17
4.2.1 Uppodling av <i>Lactobacillus delbrueckii subart. lactis ATCC<sup>®</sup> 7830<sup>TM</sup></i> .....	17
4.2.2 Haltbestämning av <i>Lactobacillus delbrueckii subart lactis ATCC<sup>®</sup> 7830<sup>TM</sup></i> .....	18
4.3 BEREDNING AV STANDARDLÖSNING AV VITAMIN B <sub>12</sub> .....	18
4.4 PROVBBEREDNING .....	18
4.5 BEREDNING AV KULTURMEDIUM .....	19
4.6 YMPKULTUR .....	19
4.7 BESTÄMNING AV OPTISK DENSITET .....	20

4.8 BERÄKNING OCH BEARBETNING AV DATA .....	20
<b>5. RESULTAT .....</b>	<b>20</b>
5.1 TORRVIKTSBESTÄMNING .....	20
5.2 TEMPERATURMÄTNING .....	20
5.3 HALTBESTÄMNING AV <i>LACTOBACILLUS DELBRUECKI</i> .....	21
5.4 ANALYS AV VITAMIN B <sub>12</sub> .....	21
<b>6. DISKUSSION.....</b>	<b>24</b>
6.1 TORRSUBSTANS.....	24
6.2 TEMPERATUR .....	24
6.3 TILLVÄXTMEDIUM OCH HALTBESTÄMNING .....	25
6.4 STANDARDSERIER OCH KALIBRERINGSKURVOR.....	26
6.5 VITAMIN B <sub>12</sub> .....	26
6.6 BAKTERIETILLVÄXT VID VITAMIN B <sub>12</sub> -BESTÄMNING .....	28
6.7 PROVBEREDNING OCH VITAMIN B <sub>12</sub> -EXTRAKTION.....	28
6.8 TIDIGARE STUDIER .....	29
<b>7. SLUTSATS.....</b>	<b>31</b>
<b>8. LITTERATURFÖRTECKNING.....</b>	<b>32</b>

## BERÄKNINGAR

# 1. INTRODUKTION

Halten näringsämnen i livsmedel varierar bland annat beroende på tillagningsmetod, lagringstid och lagringsförhållanden, som exponering för ljus och syre. Det är känt att olika tillagningsmetoder påverkar innehållet av vitaminer olika mycket, beroende av bland annat vattenmängd, pH, temperatur och tillagningstid (1).

Svenska Livsmedelsverket har en livsmedelsdatabas över näringsinnehåll för olika livsmedel, med data för obearbetade livsmedel och livsmedel som processats på olika sätt. Data erhålls genom kemiska och mikrobiologiska analyser, direktvärden från livsmedelsindustrin samt uppskattade värden. Information om näringsinnehåll i livsmedel tillagade i mikrovågsugn saknas (2).

Studier har gjorts på mikrovågors inverkan på olika näringsämnen, framförallt på vitamin C eftersom det finns många analysmetoder för vitamin C (3), medan få studier är gjorda på vitamin B<sub>12</sub>. Forskningsstudier har skapat olika uppfattningar och fördomar om mikrovågstillagning och mikrovågors inverkan på livsmedelskomponenter. Oklarheter finns för mikrovågors inverkan på näringsämnen och framförallt på vitamin B<sub>12</sub>. Vitamin B<sub>12</sub> är ett essentiellt näringsämne, som många äldre får brist på. Detta är av intresse eftersom många hemboende äldre människor idag får hemleverans av färdiga måltider som är avsedda att värmas, ofta i mikrovågsugn (4).

## 2. SYFTE

Syftet med denna studie är att genom litteratursammanställning om vitamin B<sub>12</sub> och mikrovågor samt genom bioassay kunna ge en indikation på om uppvärmning genom mikrovågor påverkar halten vitamin B<sub>12</sub> i färdiga kylda måltider.

## 3. BAKGRUND

### 3.1 VITAMIN B<sub>12</sub>

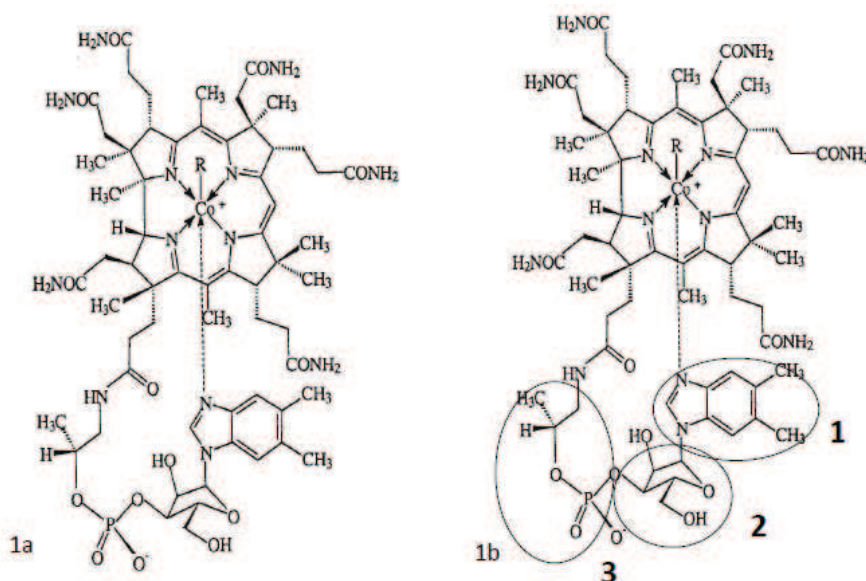
#### 3.1.1 Kemisk struktur

Strukturen för vitamin B<sub>12</sub> är komplex, den är baserad på ett corrinring-system med en koboltjon i centrum av molekylen (figur 1a). Den sjätte bindningsjonen (-R) varierar beroende på den kemiska miljön. Inbindningsjonen kan binda antingen

cyanin (CN) som bildar cyanokobalamin, en hydroxylgrupp (OH) som bildar hydroxokobalamin, en vattenmolekyl (H<sub>2</sub>O) bildar aquakobalamin, nitrit (NO<sub>2</sub>) som bildar nitritkobalamin, en sulfitgrupp (SO<sub>3</sub>) som bildar sulfitkobalamin, en metylgrupp (CH<sub>3</sub>) ger metylkobalamin eller 5'-deoxyadenosyl som bildar adenosylkobalamin (5).

Alla dessa former av vitamin B<sub>12</sub> kallas gemensamt för kobalaminer och finns i djur och bakterier men saknas hos växter (undantag för vissa alger) och svampar (6). I sjöar och hav utsöndras kobalamin av vitamin B<sub>12</sub>-producerande alger och bakterier samt från döda celler och organiska partiklar. Halten vitamin B<sub>12</sub> varierar beroende på miljöfaktorer som temperatur, näringstillgång och planktonarter. Till exempel ses högst koncentration av vitaminet under vintern och lägst koncentration under våren (7).

Det förekommer också vitamin B<sub>12</sub>-analoger som inte har någon biologisk aktivitet i människan. De har liknande struktur men absorberas inte av tarmen som de naturliga formerna av vitamin B<sub>12</sub> gör. Dessa analoger skiljer sig från kobalamin på olika sätt, vilket ses i figur 1b (8; 9)



**Figur 1:** Vänster figur, **1a**, visar kemisk struktur för vitamin B<sub>12</sub>. Den centrala strukturen består av fyra pyrrolringar. Bokstaven R motsvarar antingen -CN (cyanokobalamin), -OH (hydroxokobalamin), H<sub>2</sub>O- (aquakobalamin), -NO<sub>2</sub> (nitritkobalamin), -SO<sub>3</sub> (sulfitkobalamin), -CH<sub>3</sub> (metylkobalamin) eller 5'-deoxyadenosyl (adenosylkobalamin). Formerna av vitamin B<sub>12</sub> varierar beroende på vitaminets omgivande miljö (5).

Höger figur, **1b**, visar kemisk struktur för vitamin B<sub>12</sub>-analoger. Cirkel 1 representerar 5,6 dimetylbensimidazol, cirkel 2 representerar ribos, medan cirkel 3 representerar en fosfatjon och propionamid. Om 5,6 dimetylbensimidazol (cirkel 1) elimineras, bildas cobyrynsyrahexaamid. Om både cirkel 1 och 2 elimineras från molekylen, bildas kobalamid. Om alla tre cirklar bortfaller bildas kobamid [Inspirerad av (5; 10)].



### 3.1.2 Stabilitet

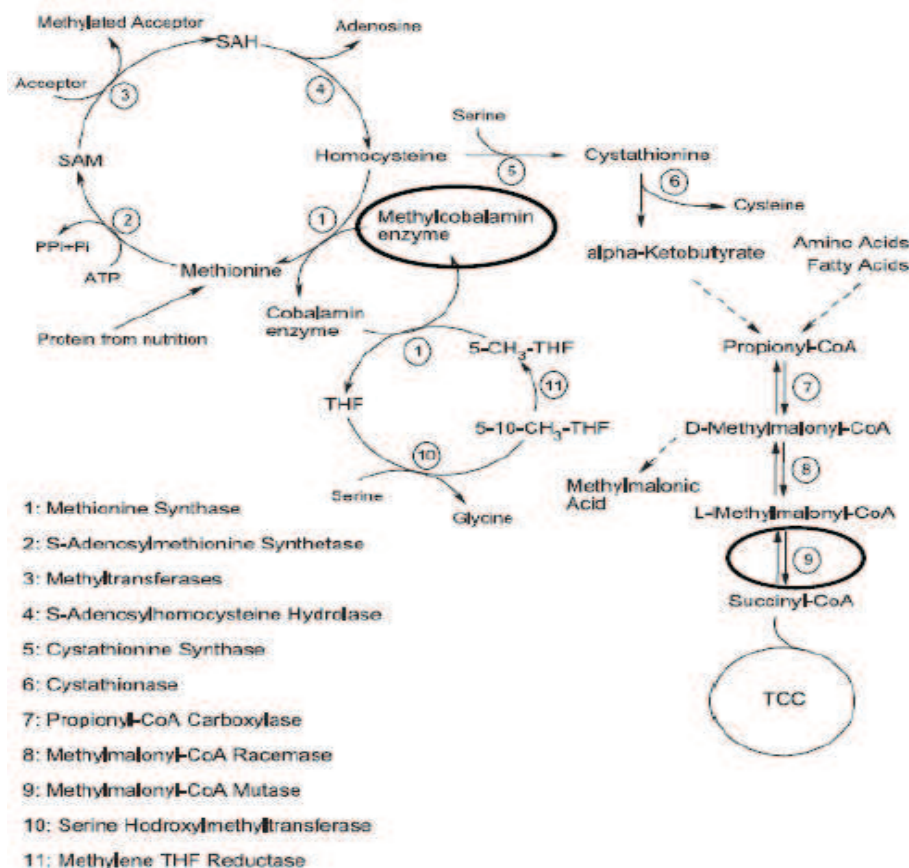
Vitamin B<sub>12</sub> är en relativt värmestabil och vattenlöslig molekyl. Den är känslig för lågt pH, alkaliska lösningar och ljus (6). Vitamin B<sub>12</sub> är mest stabil mellan pH 4-7. Reducerande ämnen såsom askorbinsyra, järnsalt och sulfid inducerar dissociering av molekylerna (11) samt har en katalyserande effekt för inaktivering av vitaminet (6). I likhet med andra vattenlösliga vitaminer, är även vitamin B<sub>12</sub> känslig för urlakning (11).

Den mest stabila formen av vitamin B<sub>12</sub> är cyanokobalamin. Metylkobalamin, adenosylkobalamin och hydroxokobalamin är alla ljuskänsliga och omvandlas lätt till cyanokobalamin vid förekomst av cyanid i den omgivande miljön (10). Cyanid dissocierar från cyanokobalamin vid exponering av ljus och bildar hydroxokobalamin. I neutrala och sura lösningar förekommer hydroxokobalamin som aquakobalamin (9). Mekanismen för hur vitamin B<sub>12</sub> bryts ner är ännu inte fullständigt förklarad på grund av molekylens komplexitet. Det beror också på att vitamin B<sub>12</sub> förekommer i låga koncentrationer, generellt 1-10 µg/100g livsmedel, samt på grund av dess aktiva och inaktiva former (5; 11).

### 3.1.3 Funktion

Adenosylkobalamin och metylkobalamin är de aktiva formerna av vitamin B<sub>12</sub> och fungerar som coenzym (4; 12). Dessa två former deltar i två olika enzymatiska reaktioner i människokroppens metabolism. Adenosylkobalamin medverkar i katabolismen av propionat. Den fungerar där som coenzym till metylmalonyl-CoA-mutas, som katalyserar omvandling av metylmalonyl-CoA till succinyl-CoA, som är en viktig metabolit i citronsyracykeln.

Metylkobalamin deltar i remetylering av homocystein till metionin, genom katalys av metioninsyntetas (12). Detta sker då vitamin B<sub>12</sub> binder in en metylgrupp från 5-metyltetrahydrofolsyra (5-CH<sub>3</sub>-THF) som då omvandlas till tetrahydrofolsyra (THF). Den inbundna metylgruppen överförs till homocystein och metionin bildas (figur 2) (11). Metionin är en essentiell aminosyra, som bland annat reagerar med adenosyltrifosfat (ATP) för bildning av S-adenosylmetionin (SAM). SAM deltar som metylgruppsbärare i många reaktioner inom cellen, eftersom den bär på en reaktiv metylgrupp (13).



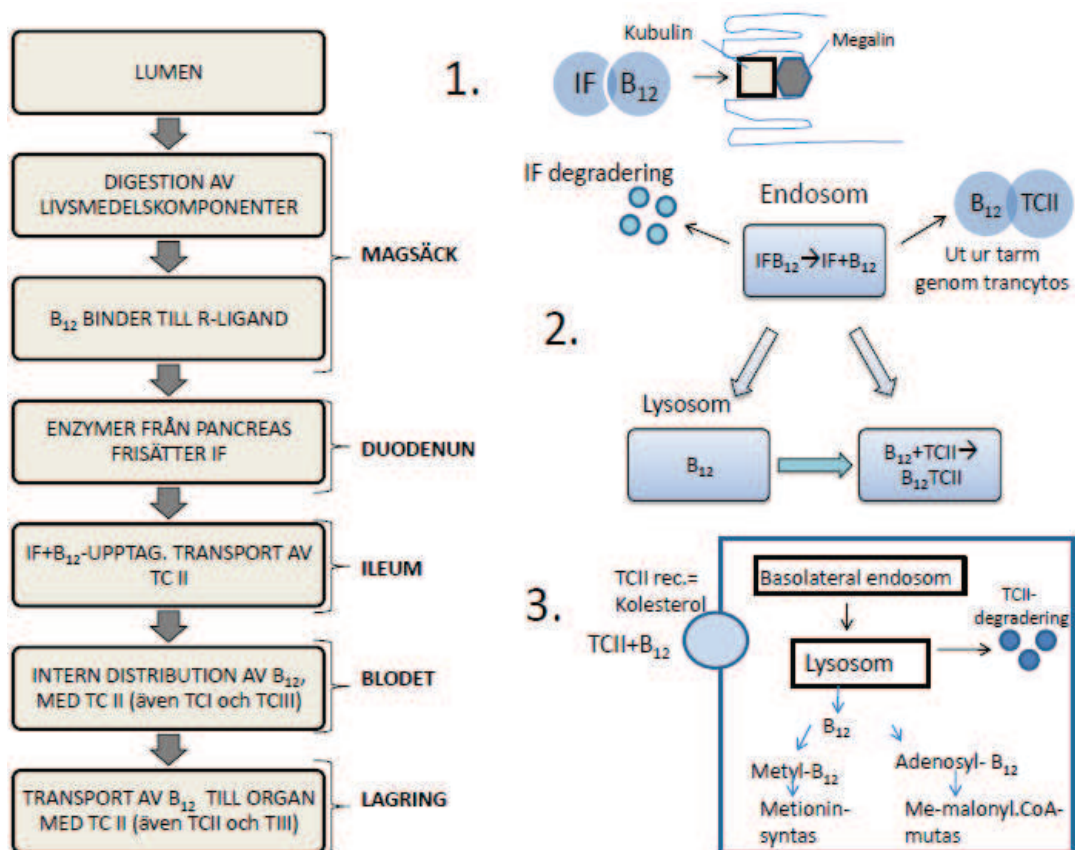
**Figur 2:** Adenosylkobalamin deltar i bildningen av metylmalonyl-CoA-mutas, som katalyserar bildning av succinyl-CoA (nedre markerad cirkel), en komponent i citronsyra cykeln (TCC). Bilden visar också hur kobalamin binder in en metylgrupp från 5-metyltetrahydrofolsyra (5-CH<sub>3</sub>-THF) och bildar metylkobalamin (övre markerad cirkel), som medverkar vid bildning av metionin (12).

### 3.1.4 Absorption

Cirka 50 % av det vitamin B<sub>12</sub> som intas via maten, absorberas i tunntarmen. Alla naturliga former av vitamin B<sub>12</sub> absorberas och transporteras på samma sätt, därför har det ingen betydelse vilken form av vitaminet som intas (9).

I magsäcken sker proteinnedbrytning vilket gör att vitamin B<sub>12</sub> kan frisättas från bland annat livsmedelskomponenter. Vitamin B<sub>12</sub> binds i sin fria form med låg affinitet till kobalaminbindande protein. När komplexet anländer till den alkaliska miljön i duodenum bryts bindningen mellan kobalamin och bindningsproteinet. Det återigen fria vitaminet binds in till ett glykoprotein, en inre faktor (IF). IF bildas av parietalceller i mukusmembranet i magsäckens slemhinna (14). IF binder in alla naturliga former av vitaminet med lika hög affinitet (8). IF känner inte igen vitamin B<sub>12</sub>-analoger eftersom analogerna saknar 5, 6 dimetylbensimidazol (15). Inbinding mellan vitamin B<sub>12</sub> och IF skyddar vitaminet från att bindas till andra kostkomponenter eller förstöras av mikroorganismer i tarmen eller födan (12).

I figur 3 visas bland annat hur komplexet, vitamin B<sub>12</sub>/ IF, binder till receptorproteinet kubulin på tarmcellernas mikrovilli i nedre delen av tunntarmen (ileum). Med hjälp av proteinet megalin initieras Ca<sup>2+</sup>-beroende endocytos. Komplexet tas därefter upp av endosomer och lysosomer. Det låga pH:t frisätter kobalamin från komplexet. Det råder dock delade meningar om vilka protein som binder upp vitamin B<sub>12</sub> i den fortsatta vägen genom kroppen. Det frigjorda vitaminet transporteras genom tarmepitelet och binder slutligen till ett serumprotein, transkobalamin II (TCII). Därefter transporteras vitamin B<sub>12</sub> ut ur tarmen via transcytos för transport i blodet (12; 14). Ungefär 95 % av totala mängden absorberat vitamin transporteras i portådern, medan cirka 5 % transporteras i lymfocyterna. Vitaminet transporteras framförallt i form av adenosylkobalamin och tros huvudsakligen vara bundet till transkobalamin II. Vitaminet kan även vara bundet till transkobalamin I (TCI) eller transkobalamin III (TCIII). Vitaminet transporteras i första hand till levern (6; 14; 16) men även till hud, muskler och blodplasma (9).



**Figur 3:** Fysiologisk översikt av vitamin B<sub>12</sub>-absorption. Kobalamin frisätts i magsäcken och transporteras till duodenum, där en inre faktor, IF, binder in vitamin B<sub>12</sub> (nr1). I ileum frisätts kobalamin från IF och binder med TCII som transporterar vitaminet ut ur tarmen (nr 2). I cellen degraderas TCII så att vitamin B<sub>12</sub> kan utöva sin aktivitet (nr3). I blodbanan är kobalamin framförallt bundet till TCII, men även till TCI och TCIII. Transporten av kobalamin sker huvudsakligen till levern, för lagring [Inspirerad av (17)].

Via avföring utsöndras en relativt stor mängd vitamin B<sub>12</sub>. Detta tros till stor del härstamma från bakteriesyntes av vitaminet i tjocktarmen. Upptag av vitamin B<sub>12</sub> kan inte ske i tjocktarmen eftersom både IF och IF-receptorer saknas (11).

Uppskattningsvis uppgår den dagliga förlusten av vitamin B<sub>12</sub> till 0,1 % av kroppens totala lager (4).

Intag av stora mängder vitamin B<sub>12</sub> kan resultera i ofullständig absorption av vitaminet. Detta beror antagligen på det begränsade antalet receptorer som finns i tunntarmen, uppskattningsvis finns där en receptor per mikrovilli (9). Vitamin B<sub>12</sub>-absorption kan därför vara mer effektiv om vitamin B<sub>12</sub> inkluderas i flera måltider (6).

För att förhindra vitamin B<sub>12</sub>-brist kan vitaminet intas i stora doser, vilket gör att små mängder av vitaminet, men ändå betydelsefulla mängder för kroppen, absorberas genom passiv diffusion i hela tunntarmen. En parenteral tillförsel av vitaminet, via injektion, eller tillförsel i tablettform (18) är troligen mer effektiv vid sådana situationer (6).

### 3.1.5 Behov och rekommendationer

Behov och rekommendationer av vitamin B<sub>12</sub> varierar beroende på bland annat åldersgrupp och individgrupp, tabell I. Minimumintaget av vitamin B<sub>12</sub> för friska vuxna individer ligger mellan 0,30-0,65µg/dag (4), medan det dagliga rekommenderade intaget är 2,0µg/dag (19).

**Tabell I:** Rekommendationer av vitamin B<sub>12</sub> (19).

Individgrupp	Rekommendation
Spädbarn (6-11 månader)	0,50µg/dag
Spädbarn (12-23 månader)	0,60µg/dag
Mindre barn (2-5 år)	0,80µg/dag
Barn (6-9 år)	1,3µg/dag
Ammande kvinnor	2,6µg/dag
Vuxna (10-75 år)	2,0µg/dag

De rekommenderade behoven tillfredställs med en blandad kost. Bland annat uppnås cirka 50 % av det rekommenderade dagliga intaget av vitamin B<sub>12</sub>, genom 2,5dl mjölk (20). Svenska befolkningen får enligt riksmaten 1998, i sig vitamin B<sub>12</sub> till 44 % från kött, fågel, ägg, korv; 23 % från fisk och skaldjur; 16 % från mjölk, fil och yoghurt samt 6 % från ost. Individer som är i riskzonen att drabbas av vitamin B<sub>12</sub>-brist rekommenderas tillskott av vitamin B<sub>12</sub> (4). Genomsnittligt dagligt intag av vitaminet i Sverige är idag 6,9µg bland både män och kvinnor (6).

### 3.1.6 Brist av vitamin B<sub>12</sub>

Vid bristfälligt intag av vitamin B<sub>12</sub> uppstår symptom först efter en längre tid av bristande kost, vanligtvis efter 3-5 år när leverns lager av vitamin B<sub>12</sub> är slut (21). Symptom som kan uppkomma vid vitamin B<sub>12</sub>-brist redovisas i tabell II.

**Tabell II:** Symptom vid brist av vitamin B<sub>12</sub> (6).

<b>Symptom</b>
Trötthet
Lägre resistens för infektioner
Irritabilitet
Depression
Hallucinationer
Brännande tunga, ofta röd och glansig
Hjärtklappning
Blekhet
<b>Bristreaktioner</b>
Inhiberad cellmetabolism
Minskad DNA produktion
Neuropati
Ökade homocysteinnivåer

Vid vitamin B<sub>12</sub>-brist påverkas cellernas folatmetabolism. Coenzymet metylkobalamin minskar vid vitamin B<sub>12</sub>-brist, vilket leder till minskning av metioninbildning, som visas i figur 2. Brist leder till ackumulering av 5-metyltetrahydrofolsyra. Dels eftersom reduktion till 5,10 metylen-THF är termodynamiskt irreversibel och dels eftersom regenerering av THF genom demetylering är omöjlig. Detta leder till minskning av andra folatderivat som är viktiga för bland annat purin- och pyrimidinsyntes. Konsekvensen blir att DNA-syntesen minskar, vilket kan innebära att Perniciös anemi (megaloblastisk anemi) uppstår (9).

Perniciös anemi är en sjukdom där den röda benmärgen inte kan producera röda blodkroppar normalt utan istället bildas ett fåtal stora deformerade blodkroppar. Det leder till blodbrist (4) (6). Risken för att utveckla perniciös anemi har setts öka med ökad ålder, från och med 50 år (21). Prevalensen för perniciös anemi i Sverige har uppskattats till 2,6 ‰ (4).

Brist av vitamin B<sub>12</sub> kan även orsaka nervskador, neuropati, på grund av minskad produktion av myelin, som omger och skyddar nervceller (9). Neuropati yttrar sig som känselnedsättning, svaghet samt försvagade reflexer hos sensoriska och motoriska nervfibrer (22). Det startar vanligtvis i de perifera nerverna vilket påverkar händer och fötter och sprids till ryggrad och hjärna (9). Neurologiska komplikationer förekommer hos 75-90 % av alla individer med vitamin B<sub>12</sub>-brist (16).

Vid vitamin B<sub>12</sub>-brist sker också ackumulering av homocystein, som vid höga halter har pro-arterosklerotiska effekter, till exempel skadar endotel på blodkärl (23). Homocystein kan vara en av många faktorer som kan orsaka neurologisk obalans. Såsom setts i figur 2, omvandlas homocystein till metionin i närvaro av metylkobalamin-enzym (14).

Brist på vitamin B<sub>12</sub> beror i de flesta fall på att den inre faktorn saknas. Detta beror framförallt på genetiska betingelser men kan även bero på eventuell operation eller ingrepp i de områden i magsäcken där denna faktor produceras (6).

En bristande absorption kan också bero på vissa typer av tarmsjukdomar, såsom celiaki och Crohns sjukdom (skada i nedre delen av tunntarmen där absorption av vitaminet sker). Även parasiter, alkoholmissbruk eller läkemedel kan orsaka ett sämre upptag av vitamin B<sub>12</sub> (6).

Riskgrupper för vitamin B<sub>12</sub>-brist är därmed individer med bristfällig kost såsom alkoholmissbrukare, individer med försämrad absorption samt veganer och äldre (4; 6).

### *3.1.7 Brist hos äldre*

Av alla äldre människor i Sverige, uppskattas cirka 10 % drabbas av brist på vitamin B<sub>12</sub> (4; 6). Absorptionen av vitamin B<sub>12</sub> kan störas på olika sätt. Vid åldrande kan en atrofiering (tillbakabildning) av magsäcksslemhinnan ske med otillräcklig produktion av saltsyra och pepsin som resultat. Detta kan leda till att pH:t i magsäcken inte blir tillräckligt lågt för att det proteinbundna vitaminet ska kunna frigöras. Det leder till att bildning av IF kan hämmas. Uppskattningsvis har ca 3 % av individer över 65 år denna tillbakabildning (11).

Absorption av vitamin B<sub>12</sub> kan också hämmas av olika läkemedel, speciellt av protonpumpsinhiberare, såsom Omeprazole och Lansoprazole (24; 25). Enligt Sveriges läkemedelsverk skrevs det år 1999 ut 2,46 så kallade dagsdoser av pumpinhibitorer/100 individer och dag (26). Protonpumpsinhiberare minskar utsöndring av saltsyra i magsäcken, vilket bland annat leder till ett högre pH i tunntarmen. Konsekvensen av detta är att frisättning av proteinbundet kobalamin både i magsäcken och i tunntarmen minskar. Även kolesterolsänkande läkemedel har setts påverka absorption av kobalamin. Detta kan bland annat bero på att de reducerar antalet fria kalciumjoner i tarmen, vilka krävs för upptag av vitamin B<sub>12</sub> (12).

## 3.2 MIKROVÅGOR

Mikrovågor används allt mer för att snabbt upphetta livsmedel på ett energisnålt sätt (27). Den ökande användningen kan bero på det ökade sortiment av färdiglagade måltider som produceras av livsmedelsindustrin och som säljs i de flesta livsmedelsbutiker. I vanliga hushåll används mikrovågsugnen framförallt till för tillagning och upphettning, men också för torkning av livsmedel (28).

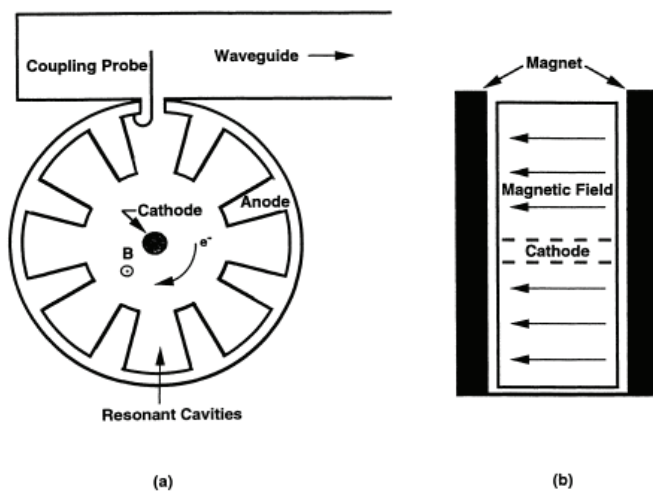
Vid konventionell uppvärmning som kokning och ugnstillagning sker uppvärmning av livsmedlet genom att energi överförs via konvektion, konduktion och värmestrålning från livsmedlets yta till dess mitt (27). Uppvärmningskärlet blir varmare än livsmedlet, vilket kan leda till att vissa delar av livsmedlet blir överhettade eller att vissa delar av livsmedlet sönderdelas på grund av den höga värmen. I mikrovågsugnen sker uppvärmning från mitten till ytan av livsmedlet (29).

Konventionella metoder kräver längre tid och mer energi för uppvärmning jämfört med mikrovågsugnen. I en väl designad mikrovågsugn, bland annat med roterande platta där livsmedlet kan placeras, sker en relativt enhetlig uppvärmning genom hela produkten (29).

### 3.2.1 Funktion

Mikrovågor är en dielektrisk värmningsmetod, vilket betyder att värmning sker genom icke konduktiva material. Mikrovågor är elektromagnetiska vågor med frekvens som genereras från en magnetron (28). Frekvensen (svängningar/sekund) av mikrovågor varierar mellan 300 Mega Hertz (MHz) och 300 Giga Hertz (GHz), vilka är ekvivalenta med våglängder mellan 0,001 till 1 meter (30). Den vanligaste frekvensen i hushållsmaskiner är 2450 ( $\pm$  50) MHz (29) med en våglängd på ungefär 12 cm (31).

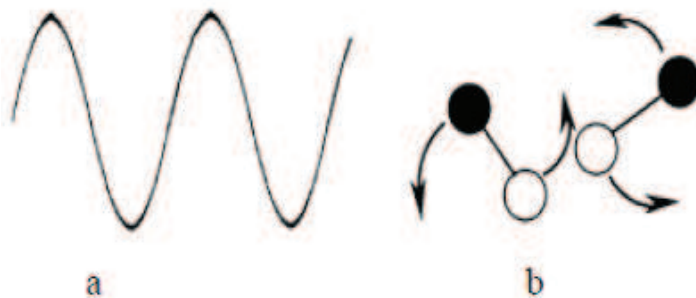
Mikrovågsugnen består av tre huvudkomponenter; källan, transmissionslinjen och applikatoren. Källan, ofta en magnetron, genererar elektromagnetisk strålning genom den uppkomna potentialskillnaden mellan anod och katod. Transmissionslinjen, så kallad vågguide, transporterar de producerade elektriska vågorna från källan till applikatoren, där energin antingen absorberas eller reflekteras av materialet för att nå livsmedlet (figur 4) (27).



**Figur 4:** Magnetron (a) ovanifrån och (b) från sidan. Elektriskt fält genereras genom potentialskillnader mellan anod och katod i magnetronen. En extern magnet används för att generera ett magnetfält till det elektriska fältet. Det pålagda magnetiska fältet producerar en kraft mot elektronerna som då accelererar mot anoden. De elektriska vågorna förflyttas genom vågguiden för att till slut nå applikatorn för absorption eller reflektion (27).

De producerade vågorna transporteras genom ett rör till ugnsutrymmet där energin sprids, vanligtvis genom en energispridare. I ugnen finns en fläkt som förhindrar överhettning av magnetronen. Genom oberoende strömbrytare fungerar magnetronen endast när ugnsluckan är stängd (28).

Mikrovågor består av ett elektriskt och ett magnetiskt fält (28). Värme uppstår genom jonisk konduktion och dipolär polarisation, så kallad dipolrotation (29). Jonkonduktion innebär att laddade partiklar vibrerar fram och tillbaka genom påverkan av elektriskt fält. Dipolrotation baseras på molekyler med en negativ och en positiv ände, som försöker anpassa sig till det pålagda svängande elektriska fältet. När riktningen på mikrovågsfältet förändras börjar dipolerna att svänga tillbaka, dipolrotation uppstår. Utan det elektriska fältet, är dipolerna kopplade i långa kedjor och är relativt stationära (31). När ett elektriskt fält är pålagt startar dipolerna att rotera (figur 5) och joner att röra sig mot fältet, för att sedan ändra riktning när mikrovågsfältet förändras (27; 28; 30).



**Figur 5:** Dipoler (b) anpassar sig till det elektriska fältets riktning (a). När det elektriska fältet ändrar riktning, börjar dipolerna rotera, dipolrotation uppkommer (31).



Energi från joner och dipoler konverteras till kinetisk energi och därefter till termisk energi genom friktion samt genom kollisioner med omkringliggande molekyler (29; 30). Störst värmeeffekt genereras av jonkonduktion jämfört med dipolrotation (29).

Genom jonkonduktion sker snabbare uppvärmning av saltvatten jämfört med kranvatten. Is kan inte värmas av mikrovågor på grund av dess kristallstruktur som gör vattenmolekylerna näst intill orörliga. Inte heller gas kan upphettas av mikrovågor på grund av det långa avståndet mellan de roterande gasmolekylerna (29).

Dielektriska material såsom polära organiska lösningar absorberar mikrovågor snabbt, vilket resulterar i snabb upphettning. Icke polära material utgör endast små interaktioner mellan mikrovågor och genererar endast små mängder av värmeenergi. Ingen eller mycket lite värme genereras om mikrovågor reflekteras av materialet, till exempel av metaller (29).

Penetreringsdjupet definieras som det djup där strålningsenergin i materialet är cirka 37 % av strålningsenergin på livsmedlets yta. Önskas snabb och homogen uppvärmning av livsmedel bör produkten generellt inte vara mer än 2-3 gånger så djup som penetreringsdjupet (28). Om livsmedlets tjocklek är större än penetreringsdjupet, värms endast ytan utav mikrovågor, medan återstoden värms genom konduktion (27). Penetreringsdjup och absorption av mikrovågor varierar i olika livsmedelsprodukter beroende på bland annat kombination av värmekapacitet, temperatur och vatteninnehåll (30).

### *3.2.2 Kemiska användningsområden för mikrovågor*

Mikrovågors förmåga till snabb temperaturökning används till att katalysera reaktioner inom bland annat organkemi. Det innebär att reaktionstiden mellan reaktanter blir kortare och mer effektiv. Upphettning genom mikrovågor är oftast omedelbar och specifik, utan att energikällan behöver ha direktkontakt med reaktionskärlet (31; 32).

Kappe och Stadler hävdar att kemiska reaktioner teoretiskt sett inte kan induceras av enbart mikrovågor eller genom direkt absorption av elektromagnetisk energi. Det är enbart mikrovågornas induktion till värme som skapar kemiska reaktioner. Detta beror på att mikrovågors energi är för låg för att kunna klyva molekylbindningar (tabell III och IV) (29).

**Tabell III:** Strålningstypers olika frekvenser och kvantumenergier.

Strålningstyp	Frekvens (MHz)	Kvantumenergi (eV)
$\gamma$ -strålning	$3,0 \cdot 10^{14}$	$1,24 \cdot 10^6$
X-strålning	$3,0 \cdot 10^{13}$	$1,24 \cdot 10^5$
Ultraviolet strålning	$1,0 \cdot 10^9$	4,1
Synligt ljus	$6,0 \cdot 10^8$	2,5
Infrarött ljus	$3,0 \cdot 10^6$	0,012
Mikrovågor	2450	0,0016
Radiofrekvenser	1	$4,0 \cdot 10^{-9}$

Kvantumenergierna som ses i tabell III kan jämföras med de olika bindningsenergierna för olika molekylbindningar som ses i tabell IV.

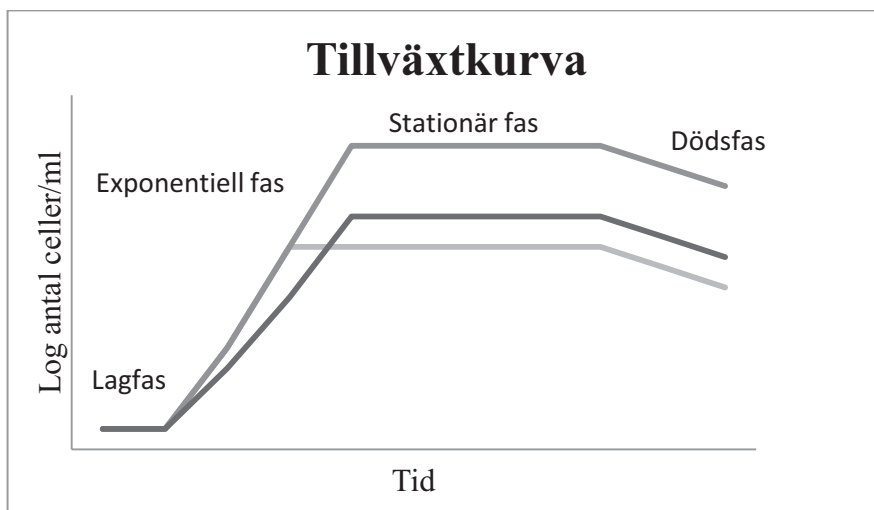
**Tabell IV:** Olika bindningstyper och bindningsenergier.

Bindningstyp	Bindningsenergi (eV)
C-C	3,61
C=C	6,35
C-O	3,74
C=O	7,71
C-H	4,28
O-H	4,80
H-	0,04-0,44

### 3.3 ANALYS AV VITAMIN B<sub>12</sub>

#### 3.3.1 Tillväxt av bakterier

En bakteriepopulations tillväxt kan beskrivas med en tillväxtkurva, figur 6. Vid ympning av bakterier till nytt medium startar vanligtvis tillväxten först efter ett par timmar. Samma sak sker om bakteriekulturen kommer från ett näringsrikt medium till ett mer näringsfattigt. Denna fas kallas lagfasen och är olika lång beroende på bakteriekulturens historia samt de nya tillväxtförhållandena. Därefter börjar cellerna dela sig och kulturen går in i exponentiell fas. Varje bakterie delar sig i två celler som också delar sig, och så vidare. Vid ympning av bakterier till samma typ av tillväxtmedium fortsätter bakterierna i exponentiell tillväxtfas, ingen lagfas uppstår. Stationär fas infaller då ett näringsämne i tillväxtmediet tar slut och/eller när ackumulering av sekretionsprodukt sker som inhiberar tillväxt av bakterierna. Vid begränsningar i näringstillgång kommer stationära fasen att uppnås tidigare. Slutligen börjar bakterierna dö och kulturen kommer in i dödfas. Dödshastigheten är något lägre i jämförelse med exponentiell fas (33).



**Figur 6:** Tillväxtkurva för bakteriepopulationer. Vanligtvis inleds tillväxten i lagfas utan celledning. Därefter delas cellerna och tillväxten sker exponentiellt. När essentiellt näringsämne tagit slut eller då inhiberande tillväxtämne ackumulerats upphör tillväxten och kulturen kommer in stationär fas. Till slut börjar bakterierna dö och kommer in i dödsfasen. Beroende på näringstillgång nås den stationära fasen vid olika tidpunkter, vilket ses för de två tillväxtkurvorna som har samma tillväxthastighet. Olika tillväxthastighet kan t.ex. ses då olika mängd ymp tillsatts [Inspirerad av (33)].

### 3.3.2 Bioassay

Bioassay är en metod som grundar sig på att ett eller flera näringsämnen, till exempel vitaminer, är begränsande, det vill säga krävs för tillväxt (34). Mikrobiologisk assay för vitamin B<sub>12</sub> är en tidskrävande men känslig och specifik metod. Metoden baseras på observationer av bakteriers tillväxt, som är proportionell mot koncentration vitamin B<sub>12</sub>. Det finns två typer av tekniker, platttest och provrörstest, som båda baseras på tillväxt av bakterier i vitamin B<sub>12</sub>-fritt tillväxtmedium där prov innehållande vitamin B<sub>12</sub> tillsatts. Platttest innebär att tillväxtmedium innehållande agar sätts till petriskålar eller glasplattor. Bakterier ympas innan agarn hinner stelna till en gel. Till gelen appliceras sedan små pappersringar som blivit blötlagda i provlösning eller i standardlösning. Efter att plattorna inkuberats mäts bakteriernas tillväxtzon omkring ringarna. Tillväxtzonen kvantifieras genom fotometrisk avläsning och jämförs med tillväxten för standard. Tillväxt i provrör sker genom att standard med känd halt vitamin B<sub>12</sub> och prov innehållande okänd halt vitamin B<sub>12</sub> tillsätts var för sig till provrör innehållande sterilt tillväxtmedium i vätskefas. Därefter ympas anpassad mängd bakterier till provrören för att sedan inkuberas (35).

Vid provrörstest som används i denna studie bedöms bakteriernas tillväxt genom turbiditetsmätning. Detta sker vanligtvis vid våglängder mellan 540-660nm. Spridningen av det inkommande ljuset ökar med ökat antal närvarande celler. En semilogaritmisk kalibreringskurva skapas med optisk densitet mot koncentration av begränsande ämne (33).

Tidigare användes titreringsanalys, där den syra (eller bas) som bakterierna bildat vid sin tillväxt kan mätas genom titrering. Därefter beräknas det stökiometriska förhållandet mellan mängd titrerad syra/bas mot det producerande ämnet (36). Metoden har till stor del ersatts med turbiditetsmätning. Detta beror på att inkuberingstiden för titreringsanalys är upptill 72h i jämförelse med 18-24h för turbiditetsmätning (34).

### 3.3.3 *Lactobacillus delbrueckii subart lactis ATCC<sup>®</sup> 7830<sup>TM</sup>*

*Lactobacillus delbrueckii* tidigare kallad *Lactobacillus leichmannii*, kräver vitamin B<sub>12</sub> för tillväxt och tar upp vitamin B<sub>12</sub> från omgivande miljö (37). Vitaminabsorption förekommer hela tiden, oavsett om cellen är i vilofas eller tillväxtfas och utan tillgång till exogen energi. Vitaminet ackumuleras huvudsakligen i cellväggen hos organismen, men även i cellens ribosomer (38). Organismen har inte möjlighet att ta upp biologiskt inaktiva analoger av vitamin B<sub>12</sub> (9). Organismen är grampositiv, stavformad, fakultativt anaerob och kan producera mjölksyra (37). Dess optimumtemperatur är 37°C (39) och den växer långsamt under 10°C samt mindre bra på agarplattor och snedagarrör i jämförelse med buljong (9; 40). För bioassay med *Lactobacillus delbrueckii* används en provbuljong innehållande alla näringsämnen organismen behöver, utom vitamin B<sub>12</sub> (7).

### 3.3.4 Provextraktion

Ett sätt att extrahera ut vitamin B<sub>12</sub> ur livsmedel är att homogenisera livsmedlet under surt pH med acetatbuffert. Eftersom den mest värmekänsliga av vitamin B<sub>12</sub>-derivaten, hydroxokobalamin, ofta förekommer i livsmedel, tillsätts kaliumcyanid (KCN) för att omvandla hydroxokobalamin till den mer stabila formen cyanokobalamin. Därefter upphettas lösningen genom kokning eller autoklivering (8).

Ett andra sätt att extrahera ut vitamin B<sub>12</sub> ur livsmedel är att bryta bindningarna mellan livsmedelskomponenter och vitaminmolekylen genom att tillsätta enzymerna  $\alpha$ -amylas och pepsin. Därefter tillsätts acetatbuffert (pH 4) och natriumcyanid. Under konstant omrörning hålls lösningen vid 42°C under 30 minuter, och värms sedan till 100°C under 35 minuter. Slutligen justeras pH till 4,8 och lämpliga koncentrationer späds för bioassay (8).

## 4. MATERIAL OCH METOD

Studiens livsmedelsprov bestod av odlad regnbåglax från Norrbotten. Den kylda måltiden bestod av regnbåglax och potatisgratäng, paketerad och tillagad på Guld\* Fisken (figur 7). Måltiden förvarades vid 5-8°C.



Figur 7: Till vänster den färdiga rätten i dess förpackning. Till höger ses bland annat innehållsförteckning och uppvärmningsinstruktioner.

### 4.1 TORRVIKTSBESTÄMNING

Cirka 1g regnbåglax från ouppvärt, mikrovågsvärt samt ugnsvärt prov vägdes upp i triplikat, och noterades med 4 decimalers noggrannhet. Proverna sattes i värmeskåp, vid 105°C under 24h, för att därefter återigen vägas. Medelvärden för provernas torrs substans samt vatteninnehåll beräknades.

### 4.2 HALTBESTÄMNING AV LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBART LACTIS ATCC® 7830™

#### 4.2.1 Uppodling av *Lactobacillus delbrueckii subart. lactis ATCC® 7830™*

Tillväxtbuljong, Micro Inoculum Broth (MIB), blandades av 2,5g proteose pepton; 10,0g jästextrakt; 1,0g kaliumdivätefosfat; 5,0g glukos; 0,05g Tween®80 samt 500ml destillerat vatten.

För ingjutning vid haltbestämning tillsattes cirka 5g bakteriologisk agar till buljongen. Båda typer av buljonger autoklaverades i 121°C under 15 minuter.

Frysta *Lactobacillus delbrueckii* subart *lactis* ATCC<sup>®</sup> 7830<sup>™</sup> ympades med en steril bomullspinne i provrör innehållande 5ml MIB-buljong. De inkuberades i 24h och ympades därefter till nya MIB-buljongrör.

#### 4.2.2 Haltbestämning av *Lactobacillus delbrueckii* subart *lactis* ATCC<sup>®</sup> 7830<sup>™</sup>

En spädningsserie gjordes av en uppvuxen kultur. Den optiska densiteten i de olika spädningrören mättes vid våglängd 546nm med en spektrofotometer. Från varje spädning pipetterades 1ml till respektive petriskål varvid 5ml MIB-agar (cirka 45°C) tillsattes. Plattorna vickades lätt så att bakterierna fördelades, agarn fick stelna i rumstemperatur. Plattorna inkuberades sedan vid 37°C. Efter 24h räknades antal kolonier, varefter halterna i de olika rören kunde korreleras med uppmätt OD-värde.

#### 4.3 BEREDNING AV STANDARDLÖSNING AV VITAMIN B<sub>12</sub>

En standardlösning bereddes under sterila förhållanden. Totalt 100mg torkad cyanokobalamin löstes upp i 1l sterilt MQ vatten och förvarades vid kylskåpstemperatur. Vid analys användes 5ml av lösningen som späddes till 100pg/ml. Genom spädningsserie gjordes standardprover i duplikat, enligt tabell V.

**Tabell V:** Standardproverna erhöles genom att blanda standardlösning innehållande cyanokobalamin (100pg/ml) med MQ- vatten. Tabellen visar volym standardlösning, volym MQ- vatten samt den erhållna koncentrationen för respektive spädning.

Rörnummer	Volym standardlösning (ml)	Volym MQ vatten (ml)	Koncentration Cyanokobalamin (pg/ml)
1R	0,0	2,5	0
2R	0,125	2,375	2,5
3R	0,25	2,25	5
4R	0,375	2,125	7,5
5R	0,50	2,0	10
6R	0,625	1,875	12,5
7R	0,75	1,75	15
8R	1,0	1,5	20
9R	2,5	0,0	250

#### 4.4 PROVBEREDNING

Till varje analysomgång (totalt sju stycken) användes två Guld\* fisken portioner. Laxfiléerna delades i 3 lika stora delar; O= ouppvärmad, M= mikrovågsvärmad och U= ugnsvärmad. De två bitarna för ouppvärmat prov förblev ouppvärmad. De två bitarna av M lades i en portion och värmdes i en Electrolux EMM 2005 mikrovågsugn, enligt förpackningsinstruktioner; 750W i 3 minuter. De två bitarna av

U lades i den andra portionen och värmdes i en Juno Convectomat ugn, enligt förpackningsinstruktioner; 150°C i 15 minuter. Temperaturen mättes på proven direkt efter att tillagning skett. Medeltemperaturen efter uppvärmning i mikrovågsugn respektive konventionell ugn beräknades för samtliga analyser.

Laxfilé av vardera prover (O, M och U) finfördelades med en sked i 250ml glasbägare. Cirka 1g prov, lika vikt för alla prov, vägdes upp och blandades med 25ml 50mM acetatbuffert (pH 4,8). Triplikat gjordes för varje grundprov (O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>; M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>; U<sub>1</sub>, U<sub>2</sub>, U<sub>3</sub>). Proverna homogeniserades i en Potter-Elvehjem homogenisator på medelhastighet under 2 minuter. Homogenatet späddes med acetatbuffert (pH4,8) till totalvolym 50ml. Till varje prov tillsattes 200µl 0,1M KCN. Proverna autoklaverades i 105°C under 5 minuter. Därefter filtrerades proverna och späddes med MQ-vatten till 100ml, så att ungefärlig koncentration  $X \cdot 10^{-10}$  g/ml erhöles.

Provlösning överfördes till provrör enligt spädningsserie, tabell VI.

**Tabell VI:** Spädningsserie för provserien för uppvärmt, mikrovågsvärmt och ugnsvärmt prov. Volym provlösning samt volym MQ- vatten.

Rörnummer	Volym provlösning (ml)	Volym MQ vatten (ml)
1	0,125ml	2,375ml
2	0,250ml	2,250ml
3	0,375ml	2,125ml
4	0,500ml	2,000ml
5	0,625ml	1,875ml

#### 4.5 BEREDNING AV KULTURMEDIUM

Vitamin B<sub>12</sub>-provbuljong (utan vitamin B<sub>12</sub>) vägdes upp till totalt 33,2g, löstes i 400ml MQ-vatten och 2ml Tween<sup>®</sup>80. pH justerades till 4,8 med 0,1M HCl.

Till varje rör; prov 1-5 ovan (O, M, U), standard (R1-R9) samt 2 stycken rör för sterilkontroll (innehållande endast 2,5ml MQ-vatten); sattes 2,5ml probuljong. Samtliga prover autoklaverades i 115°C under 10 minuter.

#### 4.6 YMPKULTUR

Bakteriekulturen som vuxit i MIB-buljong under 24h tvättades tre gånger i 0,9 % fysiologisk saltlösning. Bakteriekulturen pipetterades till 2ml stora eppendorfrör och centrifugerades i en minicentrifug (C-1200) under 60 sekunder. Vätskan pipetterades bort och pelleten löstes upp i 1,5ml 0,9 % fysiologisk saltlösning, för ytterligare centrifugering. Pelleten löstes slutligen upp i 2ml 0,9 % fysiologisk saltlösning. Optisk densitet mättes på bakterielösningen, så att antalet bakterier kunde justeras till

10<sup>9</sup> bakterier/ml. Därefter ympades 100µl av bakterielösningen till respektive provrör. Proven inkuberades i 37°C under 48h.

#### 4.7 BESTÄMNING AV OPTISK DENSITET

Spektrofotometern ställdes in på 546nm och nollades mot sterilprovet. Optisk densitet mättes på proverna och referensserien. De uppmätta turbiditetsvärdena för standardproverna användes till att göra semilogaritmiska kalibreringskurvor, med optisk densitet på y-axeln och logaritmen av vitamin B<sub>12</sub>-koncentration på x-axeln.

#### 4.8 BERÄKNING OCH BEARBETNING AV DATA

Livsmedelsprovernas vitamin B<sub>12</sub>-koncentration/100g lax beräknades genom att sätta in de analyserade OD-värdena i den erhållna kalibreringskurvan samt genom linjens ekvation. Därefter beräknades vitamin B<sub>12</sub>-halt/100g TS. Medelvärde och standardavvikelse beräknades i MiniTab. Skillnader i medelvärde beräknades med Mann-Whitney-test då värdena inte visade någon normalfördelning. En box-plot gjordes för att redovisa median och kvartiler.

### 5. RESULTAT

#### 5.1 TORRVIKTSBESTÄMNING

I uppvärmt prov beräknades mängden vatten till 65,94 % av totalvikten. Lägst vattenhalt beräknades till 53,98 % av totalvikten för ugnsvärmt prov. I tabell VII ses värden för beräknad TS. Statistisk signifikant skillnad finns mellan provernas torrsustanser, vid 95 % konfidensnivå.

**Tabell VII:** Provernas medelvärde för torrsustans. Högst TS beräknades för ugnsvärmt prov och lägst TS för uppvärmt prov.

Prov	TS
Ouppvärmd	34,06 %
Mikrovågsvärmd	35,34 %
Ugnsvärmd	46,02 %

#### 5.2 TEMPERATURMÄTNING

Högst medeltemperatur uppmättes för ugnsvärmt prov, 62°C medan mikrovågsvärmt prov uppmätte 58°C. Vid 95 % konfidensnivå finns statistisk signifikant skillnad mellan de uppmätta temperaturerna.



### 5.3 HALTBESTÄMNING AV *LACTOBACILLUS DELBRUECKI*

Tabell VIII visar antalet kolonier per platta för respektive spädning. Koncentrationen bestämdes till  $4,8 \cdot 10^{13}$  CFU/ml i odlingsmediets (MIB) ursprungsrör.

Tabell VIII: Antalet kolonier för olika spädningar. Spädning  $10^{12}$  resulterade i 48 stycken kolonier.

Spädningsfaktor	CFU/ml
$10^{10}$	1044
$10^{11}$	556
$10^{12}$	48

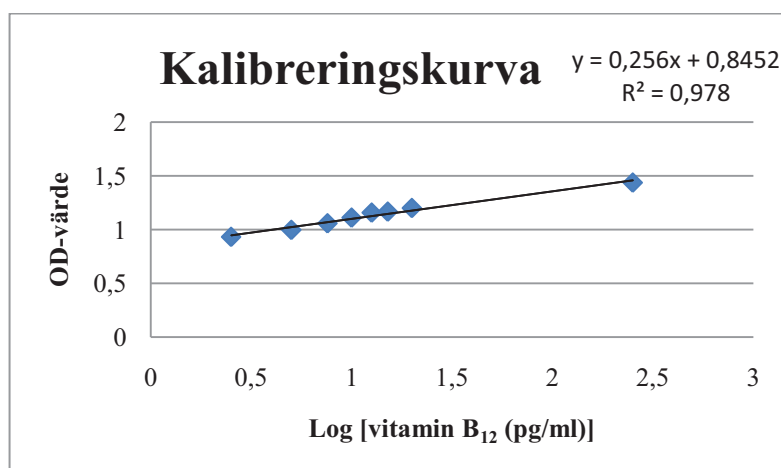
Optisk densitet kunde mätas i två av spädningarna, vilket redovisas i tabell IX. Vid spädning  $10^2$  mättes OD till 0,0701.

Tabell IX: Optisk densitet för spädningskoncentrationerna  $10^2$  samt  $10^3$ .

Spädningsfaktor	OD
$10^2$	0,0701
$10^3$	0,0081

### 5.4 ANALYS AV VITAMIN B<sub>12</sub>

Utifrån kalibreringskurvor för respektive analys, till exempel figur 8, beräknades vitamin B<sub>12</sub>-halterna för samtliga prover.



Figur 8: Semilogaritmisk kalibreringskurva för analys 1 och 2. Optisk densitet ses på y-axeln, medan log vitamin B<sub>12</sub>-koncentration ses på x-axeln. R<sup>2</sup>-värdet beräknades till 0,978. Linjens ekvation beräknades till  $y=0,256x + 0,8452$ .

Medelvärden för vitamin B<sub>12</sub>/100g lax beräknades till 3,5µg B<sub>12</sub>/100g för mikrovågsvärmt prov; och 3,7µg B<sub>12</sub>/100g för ugnsvärmt prov. Halten vitamin B<sub>12</sub>/portion (130g lax ouppvärmad) beräknades till 4,4µg B<sub>12</sub>/portion för mikrovågsvärmd lax respektive 4,2µg B<sub>12</sub>/portion ugnsvärmd lax, tabell X.

**Tabell X:** Medelvärden för halt vitamin B<sub>12</sub> för ouppvärmad, mikrovågsvärmad respektive ugnsvärmad lax.

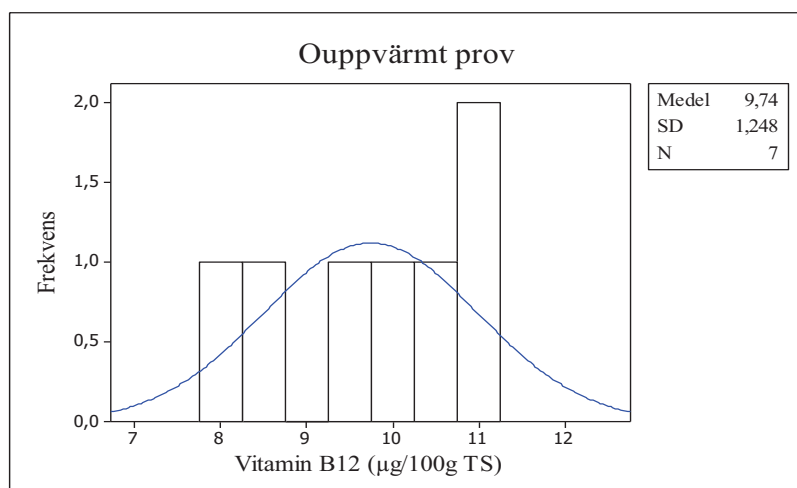
Prov	Medelvärde (µg/100g)	Medelvärde (µg/portion)	Medelvärde (µg/100g TS)
Ouppvärmt	3,3	4,5	9,7
Mikrovågsvärmad	3,5	4,4	9,8
Ugnsvärmt	3,7	4,2	8,1

Eftersom torrsubstansen skiljde sig mellan de olika proverna, beräknades även vitaminhalten per 100g TS. Koncentrationen vitamin B<sub>12</sub>/100g TS lax ses i tabell XI.

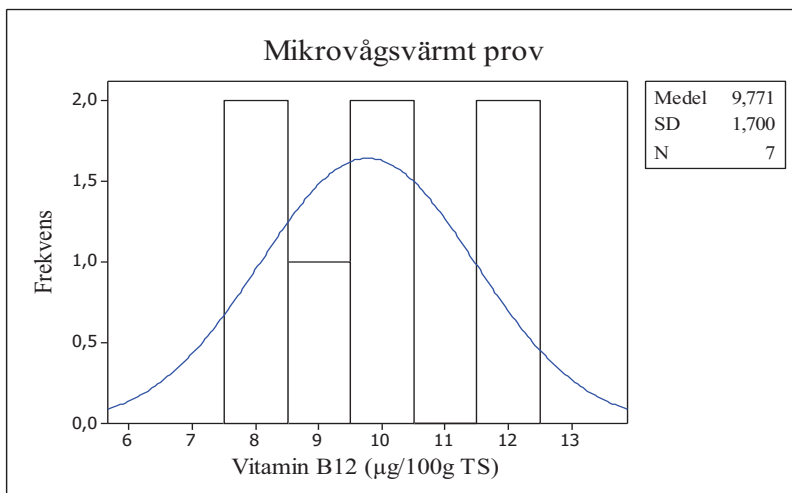
**Tabell XI:** Medelvärden för koncentration vitamin B<sub>12</sub>/100g TS för samtliga analyser, 1-7. Högst värde för respektive analys är markerad med fet stil.

	Ouppvärmd Medelvärde (µg B <sub>12</sub> /100g TS)	Mikrovågsvärmad Medelvärde (µg B <sub>12</sub> /100g TS)	Ugnsvärmd Medelvärde (µg B <sub>12</sub> /100g TS)
Analys 1	8,4	7,7	<b>8,9</b>
Analys 2	10,8	<b>12,1</b>	8,5
Analys 3	<b>7,8</b>	7,7	7,0
Analys 4	10,7	<b>11,5</b>	9,2
Analys 5	<b>9,8</b>	9,3	6,8
Analys 6	9,6	<b>10,1</b>	7,5
Analys 7	<b>11,0</b>	10,0	8,5

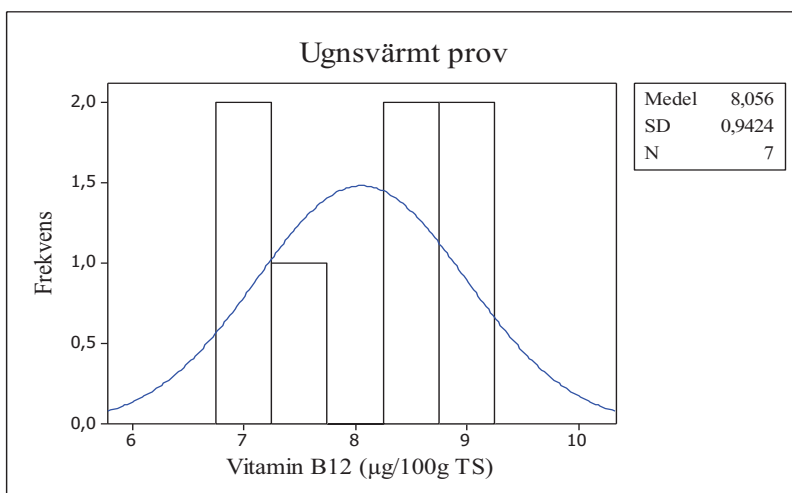
I figur 9, 10 och 11 ses normalfördelningskurvor för respektive prov (O, M, U) för samtliga sju analyser. I figurens bifogade ruta ses även medelvärde och standardavvikelse. Högst medelvärdet ses för mikrovågsvärmad prov 9,8µg/100g TS samt lägst värde 8,1µg/100g TS ses för ugnsvärmt prov. För mikrovågsvärmad prov ses även högst standardavvikelse 1,70 och lägst standardavvikelse ses för ugnsvärmt prov 0,94.



**Figur 9:** Normalfördelningskurva för ouppvärmad prov. Frekvensen ses på y-axeln och vitamin B<sub>12</sub>-halt på x-axeln. Medelvärdet och standardavvikelse ses i rutan.



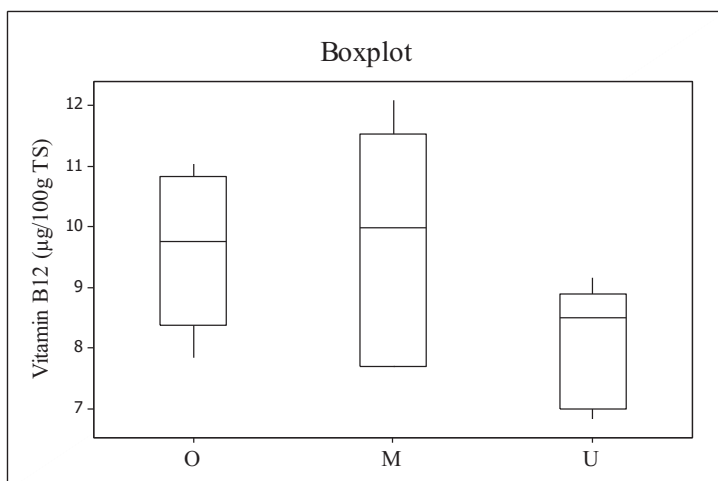
**Figur 10:** Normalfördelningskurva för mikrovågsvärmt prov. Frekvensen ses på y-axeln och vitamin B<sub>12</sub>-halt på x-axeln. Medelvärde och standardavvikelsen ses i rutan.



**Figur 11:** Normalfördelningskurva för ugnsvärmt prov. Frekvensen ses på y-axeln och vitamin B<sub>12</sub>-halt på x-axeln. Medelvärde och standardavvikelse ses i rutan.

Vid 95 % konfidensnivå beräknades p-värde för de olika provernas vitamin B<sub>12</sub>-halt (µg B<sub>12</sub>/100g TS) med Mann-Whitney-test. Nollhypotesen är att vitamin B<sub>12</sub>-halten mellan proverna inte skiljer sig åt. Statistisk signifikant skillnad ses mellan oppvärt och ugnsvärmt prov respektive mellan mikrovågsvärmt och ugnsvärmt, p=0,04. Nollhypotesen kan därmed förkastas. Ingen statistisk signifikant skillnad finns mellan oppvärt prov och mikrovågsvärmt prov, p=1,00.

Kvartiler (Q) för oppvärt, mikrovågsvärmt och ugnsvärmt prov beräknades och fördes in i en "box-plot", figur 12. Högst medianvärden, Q<sub>2</sub>, beräknades för mikrovågsvärmt prov, 10,0µg B<sub>12</sub>/100g TS. Lägst Q<sub>2</sub>-värde beräknades för ugnsvärmt prov, 8,5µg B<sub>12</sub>/100g TS. För oppvärt prov beräknades Q<sub>2</sub> till 9,8µg B<sub>12</sub>/100g TS.



**Figur 12:** Boxplot över ouppvärm, mikrovågsvärm och ugnsvärm prov. Boxarna representerar data som är uppdelade i olika kvartiler. Mittenstrecket motsvarar medianvärdet, lådans botten representerar Q1 medan boxens topp motsvarar Q3. Strecken utanför boxarna visar högsta och lägsta värde.

## 6. DISKUSSION

### 6.1 TORRSUBSTANS

De ouppvärmade proverna visade lägst torrsubstans 34,06 %. Torrsubstansen visades vara högst för ugnsvärm prov 46,02 %. Torrsubstansen för mikrovågsvärm prov beräknades till 35,34 %. Skillnaderna i torrsubstans beror antagligen på att vätska avdunstar mer vid konduktiv uppvärmning. Vid mikrovågsvärmning, kondenserar mycket av det vatten som drivs ut ur livsmedlet på livsmedlets yta. Det är troligen därför mikrovågsvärmning av livsmedel inte kan leda till någon Maillardreaktion som är möjlig vid ugnsvärmning (41). Eftersom vattenhalten varierade mellan proverna har de beräknade värdena för vitamin B<sub>12</sub>/100g torrsubstans huvudsakligen använts för beräkning av resultat.

### 6.2 TEMPERATUR

Medeltemperaturen direkt efter uppvärmning för ugnsvärm prov uppmätte 4°C högre i jämförelse med mikrovågsvärm prov. Möjligen beror detta på att vattnet som urlakas ur det mikrovågsvärmda livsmedlet kondenserar på livsmedlet yta och kyler på så sätt ner livsmedlet. Mikrovågsugnen som användes under studiens gång var av äldre modell och rikligt använd. Det är möjligt att en väl designad och nyare modell av mikrovågsugn skulle kunna leda till högre temperatur av livsmedlet.

### 6.3 TILLVÄXTMEDIUM OCH HALTBESTÄMNING

Bakteriernas uppodlingsmedium visades vara viktigt för senare tillväxt i provbuljong. I de första försöken fick bakterierna tillväxa i MRS-buljong. I det mediet tillväxte bakterierna så att tydlig tillväxt kunde ses, men vid vidare ympning till provbuljongen resulterade det i mycket liten eller knappt synbar tillväxt. Vid haltbestämning beräknades levandehalten till  $10^5$ CFU/ml, en halt som inte ens ögat kan notera. Eftersom ympantalet skulle justeras till  $10^9$ CFU/ml, resulterade det i problem. Det låga antalet skulle kunna bero på att essentiella näringsämnen tagit slut, hög ackumulering av tillväxtinhiberande ämnen eller möjligen att bakteriernas dödsfas hade inletts.

När tillväxtmediet ändrades till "Micro Inoculum Broth" sågs en tydlig ökning av antalet levande celler. Haltbestämning visade  $10^{13}$ CFU/ml, vilket innebar att kulturen späddes  $10^4$  gånger för att nå  $10^9$ CFU/ml. Bakterierna tillväxte även mycket bra i provbuljongen.

Jämförelse mellan de två medierna ses i tabell XII. Det ses att det är mängderna och sammansättningen av näringsämnen och salter som skiljer medierna åt. Mängden jästextrakt skiljer 15g mellan de två buljongerna, 20g i MIB-buljongen. Troligen är jästextraktet och köttextraktet de enda källorna innehållande vitamin B<sub>12</sub>, som är essentiellt för tillväxt av *Lactobacillus delbrueckii*. Även proteos pepton finns i båda buljongerna och mängden skiljer sig åt, 10g i MRS och 5g i MIB. Glukoshalten är dubbelt så stor i MRS-buljongen i jämförelse med MIB, även halten Tween<sup>®</sup>80 skiljer mellan buljongerna.

**Tabell XII:** Innehåll för MRS-buljong respektive för MIB-buljong. Gemensamt för de båda buljongerna är proteos pepton, glukos, Tween<sup>®</sup>80 och jästextrakt (42).

MRS	Mängd/liter	MIB	Mängd/liter
Proteos pepton	10g	Proteos pepton	5,0g
Köttextrakt	10g	Kaliumdivätefosfat	2,0g
Jästextrakt	5,0g	Jästextrakt	20g
Glukos	20g	Glukos	10g
Tween <sup>®</sup> 80	1,0g	Tween <sup>®</sup> 80	0,1g
Ammoniumcitrat	2,0g		
Natriumacetat	5,0g		
Magnesiumsulfat	0,1g		
Manganessulfat	0,05g		
Kaliumdifosfat	2,0g		

Det kan tänkas att bakterierna uppvuxna i MRS-buljong konsumerade allt befintligt vitamin B<sub>12</sub> i buljongen och därefter tömde sina egna lager av vitaminet. Dödsfasen skulle därmed kunna inträffa på grund av vitamin B<sub>12</sub>-brist. När bakterierna sedan ympades till provmaterialet kan tänkas att de fick det svårt att återhämta sig. När bakteriekultur ympades från MIB till MIB tillväxte bakterierna snabbare än när

ympning gjordes från MIB till provmedium. Antagligen beror detta på att bakterier som ympas från exponentiell fas till samma tillväxtmedium fortsätter växa exponentiellt. När bakterier ympas till nytt medium måste en anpassning till det nya mediet ske, lagfasen blir därmed längre (33).

#### 6.4 STANDARDSERIER OCH KALIBRERINGSKURVOR

För respektive analysomgång gjordes två enskilda standardserier. De uppmätta turbiditetsvärdena användes sedan för att skapa en semilogaritmisk kalibreringskurva. Dessa kalibreringskurvor skiljde sig åt trots att de borde ha sett likadana ut. Detta kan bero på spädningfel eller att olika koncentrationer av bakterier tillsatts eller att stationär fas inte inträtt. Endast en av kurvorna användes för beräkning av vitaminkoncentration i livsmedelsproverna. Vilken av kurvorna som valdes berodde på regressionslinjens värde. För högst tillförlitlighet ska kalibreringskurvans regressionslinje ( $R^2$ -värde) vara ett eller så nära ett som möjligt, vilket innebär att det finns ett linjärt samband mellan de två variablerna. Förekom ett för lågt värde förkastades serien. De erhållna  $R^2$ -värdena för dessa analyser varierade mellan 0,9220 och 0,9780.

#### 6.5 VITAMIN B<sub>12</sub>

Studien visar att ugnsvärmning i 150°C under 15 minuter minskar halten vitamin B<sub>12</sub> i den analyserade regnbågslaxen. Teoretiskt sett borde även halten vitamin B<sub>12</sub> minska under de 3 minuter av mikrovågsvärmning, vilket det inte gjorde. Tvärtom kunde en ökning av vitaminet ses i några av analyserna, i jämförelse med de ouppvärmade proverna. Detta kan visa på osäkerhet i analysen.

Värdena för vitamin B<sub>12</sub>/100g lax kan jämföras med livsmedelsdatabasen över näringsinnehåll för lax. Enligt Guld\* fiskens produktionsavdelning är laxfiléerna i de använda enportionsmåltiderna odlad regnbågslax från Norrbotten. Jämförs de analyserade vitamin B<sub>12</sub>-halterna i denna studie med livsmedelsverkets databas över regnbågslax ses jämförbara värden. Livsmedelsdatabasen har endast värden för kallrökt, varmrökt samt rå regnbågsfilé, som är odlad i Atlanten. Dessa värden varierar mellan 1,1-5,0µg B<sub>12</sub>/100g i jämförelse med studiens analyserade värden för ugnsvärmd lax med medelvärde 3,7µg B<sub>12</sub>/100g, samt för mikrovågsvärmt med medelvärde 3,5µg B<sub>12</sub>/100g. Halten vitamin B<sub>12</sub>/portion beräknades på 130g ouppvärmad lax. Oavsett om portionen var ouppvärmad, mikrovågsvärmd eller ugnsvärmd täcks det dagliga rekommenderade intaget, 2,0µg/dag, med stor marginal.

Normalfördelningskurvor visar hur de olika analysvärdena förhåller sig till varandra, samt hur nära de ligger medelvärdet, kurvans topp. Medelvärdet ses vara högst för

mikrovågsvärmt prov, 9,8 $\mu$ g B<sub>12</sub>/100g TS och lägst för ugnsvärmt prov, 8,1 $\mu$ g B<sub>12</sub>/100g TS. Standardavvikelseerna för samtliga analysvärden är höga, vilket tyder på att de genomsnittliga vitamin B<sub>12</sub>-halterna för respektive prov skiljer sig från medelvärdet. Ju lägre värden på standardavvikelsen desto närmare medelvärdet ligger de genomsnittliga halterna. Lägst standardavvikelse ses för ugnsvärmt prov, 0,9 $\mu$ g B<sub>12</sub>/100g TS.

Eftersom ingen normalfördelning kan ses mellan de analyserade vitamin B<sub>12</sub>-halterna gjordes ett icke parametriskt signifikanstest genom Mann-Whitney-test. Värdena plottades i en box-plot som åskådliggör var respektive kvartil är beläget. Mikrovågsprovet är det prov som utmärker sig mest med störst box och längst toppstreck. Detta beror på att värdena för mikrovågsproverna har stor spridning, från lägsta värde, 7,7 $\mu$ g B<sub>12</sub>/100g TS till högsta värde 12,1 $\mu$ g B<sub>12</sub>/100g TS. I jämförelse med de ugnsvärmda proverna som ligger inom intervallet 6,8-9,2 $\mu$ g B<sub>12</sub>/100g TS som därmed har en mindre box. Kvartilerna anger hur långt upp respektive ner från Q2 (medianen), 25 % av observationerna i materialet finns. Q2 representerar mittenstrecket i boxarna. Undre strecket, boxens botten, motsvarar Q1 medan övre strecket motsvarar Q3. De ugnsvärmda proverna har minst avstånd mellan Q2 och Q3 i jämförelse mellan Q2 och Q1. En box-plot baserad på sju analysvärden är dock inte helt tillförlitlig.

Nollhypotesen för signifikanstestet var att vitamin B<sub>12</sub>-värdena för de olika analyserna inte skulle skilja sig åt. Mellan ouppvärmde och ugnsvärmt prov samt mellan mikrovågsvärmt och ugnsvärmt prov sågs statistiskt signifikanta värden, då p-värdet beräknades till 0,04 för båda. Hypotesen kunde förkastas vid jämförelse mellan ouppvärmde och mikrovågsvärmt prov, då p-värdet blev 1,00, ej statistisk signifikant skillnad. Höga p-värden visar att det är väldigt låg sannolikhet att nollhypotesen är falsk.

Varför halten vitamin B<sub>12</sub> blev större i de mikrovågsvärmda proverna i jämförelse med de ouppvärmde proverna beror troligen på osäkerhet i analyserna. Det är teoretiskt omöjligt att halten vitamin B<sub>12</sub> skulle öka vid uppvärmning.

Resultaten skulle kunna vara en indikation på att mikrovågor inte förstör vitamin B<sub>12</sub> i livsmedel under 3 minuters uppvärmning som använts i denna studie. Litteraturen visar dock att vitamin B<sub>12</sub> är känslig för hög temperatur (43).

Eftersom fisken delades i 3 lika stora delar till prov O, U och M, kan variationen mellan olika fiskar räknas bort. Vitaminhalten i fisk varierar beroende på geografisk area som fisken vuxit upp i, även beroende på djurets föda, ålder och miljöfaktorer (7).

Det togs ingen hänsyn till någon mikrovågseffekt, överhettning i hörn och kanter, eftersom endast kylda produkter användes under studien. Det togs heller ingen hänsyn till att vitamin B<sub>12</sub> degraderas av solljus, varvid analyser borde ha gjorts i dimmat rött ljus eller dylikt. Dock tros minskningarna vara minimala under de timmar proverna utsattes för dagsljus.

## 6.6 BAKTERIETILLVÄXT VID VITAMIN B<sub>12</sub>-BESTÄMNING

Resultaten av analyserna av vitamin B<sub>12</sub> varierade märkbart mellan olika provomgångar. Det är viktigt att bakterierna konsumerat allt befintligt vitamin i provrören innan optisk densitet bestäms. Detta visades vara svårt att avgöra i studien. Tillväxttiden för bakterierna bör vara åtminstone 48 timmar. Dock finns en möjlighet, att kontaminerade bakterier kan börja tillväxa.

Under studien mättes turbiditeten efter 24h inkubering samt efter 48h inkubering, vilket visades ha en stor differens. Nästintill dubbla OD-värden kunde ses efter 48h. Detta innebar att bakterierna fick tillväxa under 48h för analyserna i studien. Dock mättes inte turbiditeten efter ytterligare tillväxt, vilket hade varit intressant. Det är möjligt att bakterierna behövde mer än 48h på sig att konsumera allt befintligt vitamin.

## 6.7 PROVBEREDNING OCH VITAMIN B<sub>12</sub>-EXTRAKTION

Otillräcklig provberedning och vitaminextraktion kan vara orsak till att halten vitamin B<sub>12</sub> varierade mellan triplikat av samma prov, mellan olika prov inom samma analysomgång samt mellan olika analysomgångar. Den största skillnad var 12 % mellan det högsta och det lägsta uppmätta värdet inom samma triplikat.

Livsmedelsproverna späddes i 4 olika koncentrationer och tillsattes i 4 olika provrör. Här kan felpipetteringar och felsepådningar vara en möjlig felkälla. Dock borde detta ha upptäckts vid jämförelse av de olika OD-värdena som erhöles. Triplikat gjordes av varje prov vilket minskar risken för att ett felvärde på grund av till exempel fel spädningskoncentration inte upptäcks.

Variationer i vitaminhalt i de olika proverna skulle kunna bero på olika grad av homogenisering. Trots att homogenisering skedde under lika lång tid och under samma rotationshastighet kan provernas grad av finfördelning skilja sig. Detta kan leda till försämrad frigöring av proteinbundet kobalamin. Det är möjligt att en längre tids homogenisering skulle resultera i högre mängd tillgängligt kobalamin.



Möjligen hade extraktion av vitamin B<sub>12</sub> gett annat resultat om den nämnda enzymatiska extraktionen använts. Här tillsätts bland annat enzymer för att frigöra vitaminet istället för homogenisering som användes under denna studie. Det hade varit intressant att jämföra de två metoderna, för att se om vitamin B<sub>12</sub>-halten skiljer sig beroende på använd extraktionsmetod.

## 6.8 TIDIGARE STUDIER

Viss osäkerhet finns kring ny teknologi, så även mot mikrovågsugnen och mikrovågor. Det finns begränsad litteratur för studier som jämför värmning i mikrovågsugn med konventionella metoder. En studie vilken antagligen har orsakat oklarheter bland människor då den nämns som referens i många tidningsartiklar, är en opublicerad pilotstudie från Schweiz gjord 1992. Studien refererades i Sverige 22 oktober 1993 av tidningen Expressen. På tidningens löpsedel stod: "Forskare slår larm: DU KAN BLI SJUK AV MIKROMAT" (44).

I tidningen fanns en helsida om den schweiziska forskningsrapport som grundades på blodprover, tagna på åtta testpersoner efter att de intagit mikrovågstillagad mat. Enligt forskarna sågs blodförändringar efter intag av den mikrovågstillagade maten (45). Bland annat visades ett lägre värde för hemoglobin och lymfocyter samt ett högre värde för erythrocyter och leukocyter (46). Förändringar som vid upprepad konsumtion av mikrovågstillagad mat skulle leda till cancer (45). Blodvärdena återgick efter en kort tid till det normala (44). Slutsatsen av studien resulterade i att mikrovågstillagad mat ansågs kunna vara både cancer- och allergiframkallande. Forskarna som utfört studien ansåg att regelbundet intag av mikrovågstillagad mat är skadligt och bör undvikas (45).

Den schweiziska pilotstudien är en liten studie gjord på 8 testpersoner. Den har inte publicerats i någon etablerad vetenskaplig tidsskrift, utan endast publicerats i förkortad form i allmänna tidsskrifter. Studiens upphovsman har tagit avstånd till att studien skulle ha någon relevans medan studiens andre forskare bestämt hävdade att slutsatsen stämmer (46). Vid intag av föda förändras vanligtvis blodvärdet i kroppen, bland annat ökar antalet vita blodkroppar. Med anledning av detta bör inte blodprov tas direkt efter måltid, vilket läkare är väl medvetna om. I studien togs ingen hänsyn till detta. Det gjordes inte heller någon jämförelse mellan mikrovågstillagad mat och konventionellt tillagad mat i studien (47). Forskningsresultaten cirkulerade i media under en tid och påverkade antagligen ett stort antal människor. Många bär på stor skepticism mot mikrovågor och undviker mikrovågstillagning.

Watanabe et. al visade att 30-40 % av vitamin B<sub>12</sub> går förlorat vid tillagning av kött och mjölk i mikrovågsugn. Forskarna använde sig av 10g nötkött och 100g komjölk som var för sig under 6 minuter tillagades vid effekten 500W (frekvens 2450MHz) i

mikrovågsugn. Författarna drog slutsatsen att vitamin B<sub>12</sub> degraderades till en inaktiv form som inte kan absorberas av varken den använda organismen i analysen, *Euglena gracilis* Z eller i människokroppen (48).

Studien kan diskuteras då tillagningstiden kan uppfattas som extrem. Att tillaga 10g nötkött och 100g komjölk under 6 minuter vid effekten 500W i mikrovågsugn, är en överdriven och irrelevant tillagningstid. Forskarna hävdade att vitamin B<sub>12</sub> omvandlades till en inaktiv form. Huruvida det beror av den höga temperaturen eller på grund av mikrovågor är problematiskt att veta eftersom ingen jämförelse gjordes med konventionell uppvärmning.

Riccio et. al. undersökte år 2006 koncentrationer av vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub> och B<sub>12</sub> i skinka efter olika temperaturbehandlingar, kokning i vatten samt autoklavering. Resultatet visade att tillagning vid både milda (70-100°C) och kraftiga (120°C) temperaturer, minskade innehållet av de analyserade B-vitaminerna i kött. Endast 5 minuters tillagning vid 100°C resulterade i 51 % minskning av vitamin B<sub>12</sub>. Extrem tillagning vid 120°C under 20 minuter resulterade i en minskning på 84,4 % av totalt vitamin B<sub>12</sub>. Även vitamin B<sub>1</sub> och B<sub>6</sub> reducerades kraftigt, men mindre jämfört med B<sub>12</sub> (43). Studien tyder på att det är temperaturen som leder till minskning av vitamin B<sub>12</sub>. Dock gjordes ingen jämförelse med mikrovågsvärmning i studien.

Khatoon och Prakash undersökte år 2005 näringsinnehåll i tryckkokade respektive mikrovågskokade baljväxter. Båda kokprocesserna resulterade i minskning av askorbinsyrainnehåll, vilket kan associeras med koktiden då tryckkokning (7-10 min) minskade askorbinsyrainnehållet med 10-30 % respektive 29-62 % för mikrovågskokning (30-40 min) (49).

Shazman et. al. undersökte år 2006, icke termiska effekter av mikrovågor. Studien undersökte förekomsten av Maillard-reaktioner i glukoslösning respektive glycinlösning; proteindenaturering av äggvitelösning; mutagenes hos *Photobacterium leignithi* (H169) och optisk rotation hos  $\beta$ -D-glukos samt  $\alpha$ -D-glukos. Resultaten visade att inga signifikanta skillnader kunde ses mellan mikrovågsvärmning och uppvärmning med vattenbad, varken för Maillard reaktioner, proteindentaurering, polymerlöslighet, mutagener, eller för mutarotationsjämvikt för  $\alpha/\beta$ -D-glukos (50).

Vad som sker om mikrovågsvärmning pågår under en längre tid än rekommenderat är ännu osäkert och endast ett fåtal studier finns för detta. Att jämföra studieresultat med andra studier kan vara irrelevant eftersom olika forskare använder sig av olika tillvägagångssätt vid analysering. För framtida studier skulle det vara intressant att göra fler undersökningar på näringsförluster med relevanta uppvärmningstider, många analysomgångar samt inkludering av både konventionella metoder och uppvärmning genom mikrovågor. Ett alternativ till att undersöka om mikrovågor har

någon effekt på vitamin B<sub>12</sub> skulle kunna vara under förhållanden där temperaturen har låg inverkan. Till exempel långsam upptining av livsmedel i mikrovågsugnen i jämförelse med kylskåp eller i rumstemperatur.

## **7. SLUTSATS**

De slutsatser som kan göras av den här studien är att analys av vitamin B<sub>12</sub> är en krävande metodik med många potentiella felkällor. Halten vitamin B<sub>12</sub> i regnbågslax värmd i ugn verkar minska mer i jämförelse med regnbågslax värmd i mikrovågsugn. Detta kan indikera att vitamin B<sub>12</sub> tenderar att minska beroende på temperatur och tillagningstid. Detta stöds även av litteratur som visar att temperatur och tillagningstid har störst inverkan på halten vitamin B<sub>12</sub> i livsmedel (43).

## 8. LITTERATURFÖRTECKNING

1. **Leskova', E., et. al.** Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *Journal of Food Composition and Analysis* 19. 2006. ss. 252–276.
2. **Livsmedelsverket.** <http://www.slv.se/sv/grupp1/Mat-och-naring/Vad-innehaller-maten/Om-livsmedelsdatabasen/>. [Online] 2010-03-30, 12.46.
3. **Damodaran, S., Parkin, K.L., Fennema, O.R.** *Fennema's Food Chemistry, 4th ed.*, 2006. s. 475.
4. **Nordic Council of Ministers.** *Nordic Nutrition Recommendations 2004: Integrating nutrition and physical activity.* 13:e upl., 2004. ss. 297-300.
5. **Arkbåge, K.** *Vitamin B12, Folate and Folate Binding Proteins in Dairy Products: Analysis, process retention and bioavailability.* 2003. ss. 14-24.
6. **Abrahamsson, L., Andersson, A., Becker, W., Nilsson, G.** *Näringslära för Högskolan.* 5:e upplagan, 2006. ss. 293-296.
7. **Schneider, Z., Stroiński, A.** *Comprehensive B12.* 1987. ss. 171, 194-199.
8. **Kumar, S.S., Chouhan, R.S., Thakur., M.S.** Trends of analysis vitamin B12. *Analytical Biochemistry.* 2009, ss. 1-11.
9. **Ball, G.** *Vitamins in Foods: Analysis, Bioavailability, and Stability.* 2006. ss. 278-285.
10. **Kumar, S., Aalbersberg, B.** Nutrient retention in foods after earth-oven cooking compared to other forms of domestic cooking: 2. Vitamins. *Journal of Food Composition and Analysis* 19. 2006, ss. 311-320.
11. **Blücher, A. (Red).** *Functional Foods; Nutrition, medicin och livsmedelsvetenskap.* 2005. ss. 73-83.
12. **Wolters, M., Ströhle, A., Hahn, A.** Cobalamin: a critical vitamin in the elderly. *Preventive Medicine* 39. 2004. ss. 1256-1266.
13. **Campbell, M. K., Farrell, S. O.** *Biochemistry.* 5:e upl. 2006. s. 642.
14. **Basu, T.K., Dickerson, J.W.** *Vitamins in Human Health and Disease.* 1996. ss. 110-115.
15. **Garrow, J.S., James, W.P.T., Ralph, A.** *Human Nutrition and Dietetics, 10:e upl.* 2000. ss. 275-282.

16. **Eu.** [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out80d\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out80d_en.pdf). [Online] 2010-01-26, 15.07.
17. **Seetharam, B., Bose, S., Li, N.** Cellular Import of Cobalamin (Vitamin B12). *Journal of Nutrition* 129. 1999, ss. 1761–1764.
18. **Läkemedelsverket.**  
<http://www.lakemedelsverket.se/malgrupp/Allmanhet/Lakemedel/Vad-ar-ett-lakemedel/Lakemedelssubstanser/Vitamin-B12/>. [Online] 2010-05-14, 20.10.
19. **Livsmedelsverket.** <http://www.slv.se/sv/grupp1/Mat-och-naring/Svenska-narings-rekommendationer/Rekommenderat-intag-av-vitaminer-och-mineraler/>. [Online] 2010-03-29, 21.22.
20. **Livsmedelsverket.**  
<http://www7.slv.se/livsmedelssok/detalj.aspx?livsmedelsId=129&vikt=100>. [Online] 2010-03-17, 22.01.
21. **Consultation FAO/WHO expert.** *Vitamin and mineral requirements in human nutrition: report of a joint. 2:a upl.* 1998. s. 281.
22. **Läkartidningen.**  
<http://www.lakartidningen.se/includes/07printArticle.php?articleId=9008>. [Online] 2010-04-26, 08.45.
23. **Widmaier, E.P., Raff, H., Strang, K.T.** *Vander's human physiology; The Mecanisms of Body Function. 10:e upl.* 2006. s. 457.
24. **Läkemedelsverket.** <http://www.lakemedelsverket.se/Alla-nyheter/NYHETER---2001/Kan-langvarig-behandling-med-protonpumpshammare-hamma-jarnabsorptionen/>. [Online] 2010-02-16, 09.36.
25. **Läkemedelsverket.**  
[http://www.lakemedelsverket.se/SPC\\_PIL/Pdf/humpil/Lansoprazol%20Teva%20oro-dispersible%20tablet.pdf](http://www.lakemedelsverket.se/SPC_PIL/Pdf/humpil/Lansoprazol%20Teva%20oro-dispersible%20tablet.pdf). [Online] 2010-02-16, 09.39.
26. **Läkemedelsverket.**  
<http://www.lakemedelsverket.se/malgrupp/Allmanhet/Lakemedel/Vad-ar-ett-lakemedel/Lakemedelssubstanser/Omeprazol/>. [Online] 2010-02-16, 09.38.
27. **Thostenson, E.T., Chou, T-W.** Microwave processing: fundamentals and applications. *Composites Part A* 30. 1999. ss. 1055-1071.
28. **Andersen, P.E., Risum, J.** *Livsmedelsteknologi 1: Konserveringsmetoder. 4:e upl.*, 1991. ss. 50-53.
29. **Kappe, O., Stadler, A.** *Microwaves in organic and medicinal chemistry. 1:a upl.* 2005. ss. 10-16.

30. **Khraisheh, M.A.M., Cooper, T.J.R., Magee, T.R.A.** Microwave and air drying I. Fundamental considerations and assumptions for the simplified thermal calculations of volumetric Power Absorption. *Journal of Food Engineering* 33. 1997, ss. 207-219.
31. **Lidström, P., Tierney, J., Wathey, B., Westman, J.** Microwave assisted organic synthesis-a review. *Tetrahedron report* 589. 2001, ss. 9225-9283.
32. **Larhed, M., Moberg, C., Hallberg, A.** Microwave-Accelerated Homogeneous Catalysis in Organic Chemistry. *Accounts of Chemical Research* 35. 2002. ss. 717-727.
33. **Madigan, M.T., Martinko, J.M.** *Brock Biology Of Microorganisms. 11:e upl.* 2006. ss. 142-147.
34. **Blake, C.J.** Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: a review. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 389. 2007. ss. 63-76.
35. **Schneider, Z., Stroiński, A.** *Comprehensive B12.* 1987. ss. 118-119.
36. **Ciudad, G., Werner, A., Bornhardt, C., Muñoz, C., Antileo, C.** Differential kinetics of ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria: A simple kinetic study based on oxygen affinity and proton release during nitrification. *Process biochemistry* 41. 2006. ss. 1764-1772.
37. **MeSH.**  
[http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2010/MB\\_cgi?mode=&term=Lactobacillus+delbrueckii&field=entry](http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2010/MB_cgi?mode=&term=Lactobacillus+delbrueckii&field=entry). [Online] 2010-02-04, 11.10.
38. **Sasaki, T.** Further Studies on the Binding of Vitamin B12 to Cell Wall of a B12- Requiring Lactobacillus. *Journal of Bacteriology.* 1972. ss. 169-178.
39. **ATCC.** <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=7830&Template=bacteria>. [Online] 2010-04-28. 10.31.
40. **Crew, V., Cury, B.** Lactobacillus spp. lactobacillus delbrueckii Group. *Encyclopedia of Dairy Sciences.* 2004. ss. 1494-1497.
41. **Finot, P. A., Merabet, M.** Nutritional and safety aspects of microwaves. History and critical evaluation of reported studies. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 44. 1993. ss. 65-75.
42. **BD.**  
[http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/Lactobacilli\\_MRS\\_Agar\\_&\\_Broth.pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/Lactobacilli_MRS_Agar_&_Broth.pdf). [Online] 2010-05-16. 09.41.

43. **Riccio, F., Mennella, C., Fogliano, V.** Effect of cooking on the concentration of vitamins B in fortified meat products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41. 2006. ss. 1592-1595.
44. **Fallenius, A.** Den här maten kan vara farlig. *Expressen*, nr 298. 1993. s. 8.
45. **Vindland, G.** Mikrovågor, nödvändigt eller hälsofara? *Miljömedveten* nr 4. 1996.
46. **Svensson, E.** MIKROVÅGSMAT inför rätta! *Vegetar*, nr 5. 1993. ss. 12-13, 38.
47. **Olsson, E.** Osakligt om mikrougnar. *HÄLSA*, nr 1. 1994., s. 66.
48. **Watanabe, F., Abe, K., Fujita, T., Goto, M., Hiemori, M., Nakano, Y.** Effects of Microwave Heating on the Loss of Vitamin B12 in Foods. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 46. 1998, ss. 206-210.
49. **Khatoun, N., Prakash, J.** Nutrient retention in microwave cooked germinated legumes. *Food Chemistry* 97. 2006. ss. 115-121.
50. **Shazman, A., Mizrahi, S., Cogan, U., Shimoni, E.** Examining for possible non-thermal effects during heating in a microwave oven. *Food Chemistry* 103. 2007. ss. 444-453.

## BERÄKNINGAR

Beräkning av vattenhalt i %:

$$\frac{\text{Vikt innan torkning} - \text{Vikt efter torkning}}{\text{Vikt innan torkning}} = \text{vattenhalt i \%}$$

Beräkning av TS i %:

$$\frac{\text{Vikt innan torkning} - \text{vatteninnehåll}}{\text{Vikt innan torkning}} = \text{TS i \%}$$

Beräkning av koncentrationsfaktor:

$$\text{Koncentrationsfaktor} = \frac{\text{Totalvolym}}{\text{provolym}}$$

**Exempel:**

$$\text{Prov 1: } \frac{2,5}{0,125} = 20$$

$$\text{Prov 2: } \frac{2,5}{0,25} = 10$$

$$\text{Prov 3: } \frac{2,5}{0,375} = 6,67$$

$$\text{Prov 4: } \frac{2,5}{0,5} = 5$$

$$\text{Prov 5: } \frac{2,5}{0,625} = 4$$

Beräkning av mängd vitamin B<sub>12</sub>/ml prov

Med hjälp av ekvationen från kalibreringskurvan fås  $10^{\log[B_{12}]}$ .

Vitamin B<sub>12</sub>/ml provlösning:

$$10^{\log[B_{12}]} = \frac{\text{pg } B_{12}}{\text{ml tillsatt prov}} \times \text{koncentrationsfaktor} = \frac{\text{pg } B_{12}}{\text{ml provlösning}}$$

Vitamin B<sub>12</sub>/100g livsmedel:

$$\frac{\text{pg } B_{12}}{\text{ml provlösning}} \times \frac{100\text{ml} \times 100\text{g}}{10^6} = \frac{\mu\text{g } B_{12}}{100 \text{ g lax}}$$



Beräkning av vitamin B<sub>12</sub>/uppvärmd portion:

$O = 65,94\%$  vatten

$M = 64,66\%$  vatten

$U = 53,98\%$  vatten

Skillnad i vattenhalt:  $O - M = 65,94 - 64,66 = 1,28\%$

Skillnad i vattenhalt:  $O - U = 65,94 - 53,98 = 11,96\%$

*Portionsvikt efter uppvärmning:  $130 - (\text{vattenminskning} \times 130)$*

$$\text{Vitamin} \frac{B_{12}}{\text{portion}} = \frac{\text{portionsvikt} \times \frac{B_{12}}{100g}}{100}$$

**Exempel:**

$$\text{Vitamin} \frac{B_{12}}{\text{portion}} (\text{mikrovågsvärmd}) = \frac{128,3 \times 3,45}{100} = 4,4 \mu\text{g}/\text{portion}$$



Kalmar Växjö

391 82 Kalmar  
Tel 0480-446200  
info.nv@lnu.se  
Lnu.se



**Linnéuniversitetet**