

Ásványi, B., Szücs, P., Szigeti, J. & Varga, L. (2008) Harmadik generációs biológiai tartósítószer tárolás alatti mikrobaszám-változásának vizsgálata. XXXII. Óvári Tudományos Nap "Élelmiszer-gazdaságunk kérdőjelei napjainkban – Dr. Dr. h. c. Iváncsics János (1938-2002) születésének 70. évfordulója tiszteletére". Az előadások és poszterek teljes terjedelemben megjelent anyagai. Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Mosonmagyaróvár, Compact Disc, 5 pp. [ISBN: 978-963-9883-05-5]

## HARMADIK GENERÁCIÓS BIOLÓGIAI TARTÓSÍTÓSZER TÁROLÁS ALATTI MIKROBASZÁM-VÁLTOZÁSÁNAK VIZSGÁLATA

ÁSVÁNYI B. – SZÜCS P. – SZIGETI J. – VARGA L.

Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Élelmiszer-tudományi Intézet  
9200 Mosonmagyaróvár, Lucsony u. 15-17.

### Monitoring changes in microbial counts of a third generation biological preservative during storage

#### Abstract

The objectives of this research were to develop a novel third generation biological preservative by determining the optimum growth parameters of lactic acid bacteria and to monitor the changes in viable cell counts of this product during an 8-week storage period. The optimum mixture contained *Lactobacillus plantarum* and *L. buchneri* at percentages of 47 and 53, respectively. Samples were taken after 0, 1, 2, 4, 6, and 8 weeks of storage from the products stored at either room temperature or  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ . In conclusion, the lyophilized culture of *L. plantarum* and *L. buchneri* supplemented with hydrolyzed corn grits has a shelf life of at least 8 weeks if a gas-tight packaging material is used. Added at a rate of 1% to the raw material to be preserved, this product ensures a level of  $10^5$  cfu/g of acid-producing microorganisms at the start of fermentation.

#### 1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Az erjesztéses tartósítás az elmúlt évtizedekben jelentősen elterjedt a mezőgazdasági üzemekben. Hazai éghajlati adottságaink közepette a zöldtakarmányok jelentős részét nem eredeti állapotban, hanem tartósított takarmányként (széna, silózott takarmány) vagyunk kénytelenek felhasználni. Ezek a takarmányok fontos szerepet töltenek be a szarvasmarhák fehérje-és energiaellátásában. Sajnos hazánkban a könnyen erjeszthető silókukorica esetében is nagyobb a konzerválási veszteség a biológiailag indokoltnál. A silókukoricát kifogástalan feltételek esetén 8-10 % szárazanyag-veszteséggel is lehet konzerválni. Ezzel szemben hazai üzemeink többségében a szárazanyag-veszteség 13-15 % között van, ami elsősorban a technikai feltételek hiányosságaira vezethető vissza. A közepesen és nehezen erjeszthető zöldtakarmányoknak nem kielégítő az erjedőképessége, mert a fűfélék és a pillangósok takarmányok nem tartalmaznak a jó szilázs előállításához elegendő erjeszthető szénhidrátot és nagy pufferkapacitással rendelkeznek. Ezekből a takarmányokból csak úgy lehet jó minőségű silózott takarmányt készíteni, ha természetes erjedőképességüket valamilyen módon fokozzuk.(URL<sup>1</sup>)

Munkánk célja egy új harmadik generációs biológiai tartósítószerben alkalmazható tejsavbaktérium fajok szaporodási mutatóinak vizsgálata volt.

A tartósítószerben a tejsavtermelő baktériumkultúra mellett szénhidrát-kiegészítés is szükséges (pl. hidrolizált kukoricadara), amellyel az alapanyagul szolgáló zöldtakarmány

Ásványi, B., Szücs, P., Szigeti, J. & Varga, L. (2008) Harmadik generációs biológiai tartósítószer tárolás alatti mikrobaszám-változásának vizsgálata. XXXII. Óvári Tudományos Nap "Élelmiszer-gazdaságunk kérdőjelei napjainkban – Dr. Dr. h. c. Iváncsics János (1938-2002) születésének 70. évfordulója tiszteletére". Az előadások és poszterek teljes terjedelemben megjelent anyagai. Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Mosonmagyaróvár, Compact Disc, 5 pp. [ISBN: 978-963-9883-05-5]

erjedőképessége fokozható. A biológiai tartósítószerrel, mind a közepesen, mind a nehezen erjeszhető zöldségtakarmányokból nagy biztonsággal és kevés veszteséggel kívántunk jó minőségű szilázst előállítani, amely így elsősorban pillangós zöldségtakarmányok valamint fűfélék tartósítására használható.

Kísérleteink első részében az alkalmazandó tejsavbaktérium kultúra optimális és modell környezetben mérhető szaporodási paramétereit határoztuk meg. Az így kapott adatokból az erjesztő kultúra ideális összetétele megadható, a tartósítási kísérletek eredményei alapján pedig a végső keverék összetétel kialakítható.

Megvizsgáltuk a hidrolizált, szárított kukoricadarával kiegészített keverékkultúrában a tárolása alatti sejtszám változást, illetve ennek függvényében megállapítottuk annak szavatossági idejét. Javaslatot tettünk a hidrolizált szénhidrát-kiegészítő, valamint a baktériumkultúra keverék formájában történő csomagolási módjára is.

## 2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A kifejlesztendő biológiai tartósítószer liofilizált baktériumkultúrát alkalmaztunk, amelynek tagjai a *Lactobacillus plantarum*, illetve a *Lactobacillus buchneri* fajok voltak.

Előkísérleteink során a keverék kialakításánál még további két baktériumfaj is szerepelt kísérleteinkben. *Enterococcus faecium*, illetve *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* is helyet kapott a kultúrában. Mindkét faj szerepeltetésének a célja az volt, a szilázs aerob stabilitásának növelése és az utóerjedést mértékének csökkentése volt.

Mivel a tejsavbaktériumok eredményes működésének előfeltétele a kielégítő mennyiségű erjeszhető szénhidrát jelenléte, így a mikrobák szaporodásának elősegítése céljából szénhidrát kiegészítést is alkalmaztunk, amely egy enzimesen hidrolizált majd szárított kukorica volt.

A modell szilázsok készítésekor különböző mértékű (0,1 – 1,5%) szénhidrát kiegészítéseket alkalmaztunk. A silók a 7., 15., 30., 60., és 120. napokon lettek bontva a mintákból pedig meghatároztuk a savtermelő-nem savtermelő mikrobaszámot, valamint az élesztő- és penész számot China-blue (Merck KGaA Darmstadt, Germany) Lactose agar, illetve Élesztőkivonat-dextróz-klóramfenikol agarok (YGC) segítségével. Az eredmények alapján kialakítottuk a baktériumkultúra végső összetételét.

A csomagolási formák közül előnyösnek tartottuk a szilázs tartósításához használt szénhidrátadalék és a liofilizált baktériumkultúra együttes kiszerezését, mivel így a gyártás során folyamatos élősejtszám-ellenőrzés mellett pontosan beállítható ezek aránya és az így előkészített biológiai tartósítószer alkalmazásakor további technológiai műveletek nélkül közvetlenül a silózándó alapanyaghoz adagolható. Ennek modellezése céljából az erjeszhető szénhidrátokat tartalmazó enzimesen bontott kukorica-hidrolizátumot 500 cm<sup>3</sup>-es zárható tetejű steril üveglombikokba helyeztük majd az előkísérletek alkalmával kialakított keverékkultúrában szereplő *Lactobacillus plantarum*, illetve *Lactobacillus buchneri* liofilizált tenyészetéből a kialakított inokulum keverési arányok figyelembevételével a hidrolizátumhoz kevertünk. A bekeverést laboratóriumi keverővel végeztük, ügyelve a liofilizált baktériumkultúra egyenletes eloszlására, mivel a szénhidrátforrás (hidrolizált kukoricadara) enzimes feltárása során alkalmazott hőmérsékletek hatására az anyagban kisebb rögök alakulhatnak ki, amelyeknek az össztömeghez viszonyított egyenlőtlen felület/térfogat aránya intenzív keverés nélkül mikrobák inhomogén eloszlását okozná.

Tárolási kísérleteink során minden kezelés esetében 3 független párhuzamossal dolgoztunk. Az eltérő körülmények között tárolt (szobahőmérsékleten, ill. 4±2°C-on) kezelésekből mintavétel a 0., 1., 2., 4., 6., 8. héten történt. A mintákból meghatározásra került

Ásványi, B., Szücs, P., Szigeti, J. & Varga, L. (2008) Harmadik generációs biológiai tartósítószer tárolás alatti mikrobaszám-változásának vizsgálata. XXXII. Óvári Tudományos Nap "Élelmiszer-gazdaságunk kérdőjelei napjainkban – Dr. Dr. h. c. Iváncsics János (1938-2002) születésének 70. évfordulója tiszteletére". Az előadások és poszterek teljes terjedelemben megjelent anyagai. Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Mosonmagyaróvár, Compact Disc, 5 pp. [ISBN: 978-963-9883-05-5]

a savtermelő-nem savtermelő mikrobák száma, valamint az élesztő- és penész szám China-blue (Merck KGaA Darmstadt, Germany) Lactose agar, illetve Élesztőkivonat-dextróz-kloramfenikol agarok (YGC) segítségével.

### 3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Az előkísérleteink alkalmával a négy vizsgált baktérium fajból (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri*, *Enterococcus faecium*, illetve *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii*) kialakított keveréket fonnyasztott alapanyag (elsősorban fűfélék) tartósítására kívántuk alkalmazni, amelynek szárazanyag-tartalma befolyásolja a mikrobák számára rendelkezésre álló szabad víz mennyiséget, ezért csökkentett vízaktivitású modell környezetben is megvizsgáltuk a törzsek szaporodási erélyét.

A magas ammónia termelés miatt célszerűnek tartottuk kialakított baktérium kultúra összetételének módosítását. Mivel az alkalmazott mikrobák közül potenciálisan a legnagyobb ammóniatermelő képességgel az *Enterococcus faecium* rendelkezik, ezért mellőztük e faj alkalmazását. A módosítás után nem alkalmaztuk a *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* fajt sem, mivel szaporodási mutatói elmaradtak a várakozásoktól. Az új módosított keverékben a *Lactobacillus plantarum* 47%, a *Lactobacillus buchneri* pedig 53%-ban volt jelen (1. táblázat), amelyek közül az előbbi fajt sikeresen alkalmazták már szemes kukorica tartósításában (Driehuis et al. 1999)

**1. táblázat** A módosított baktérium kultúra összetétele fonnyasztott lucerna tartósításához

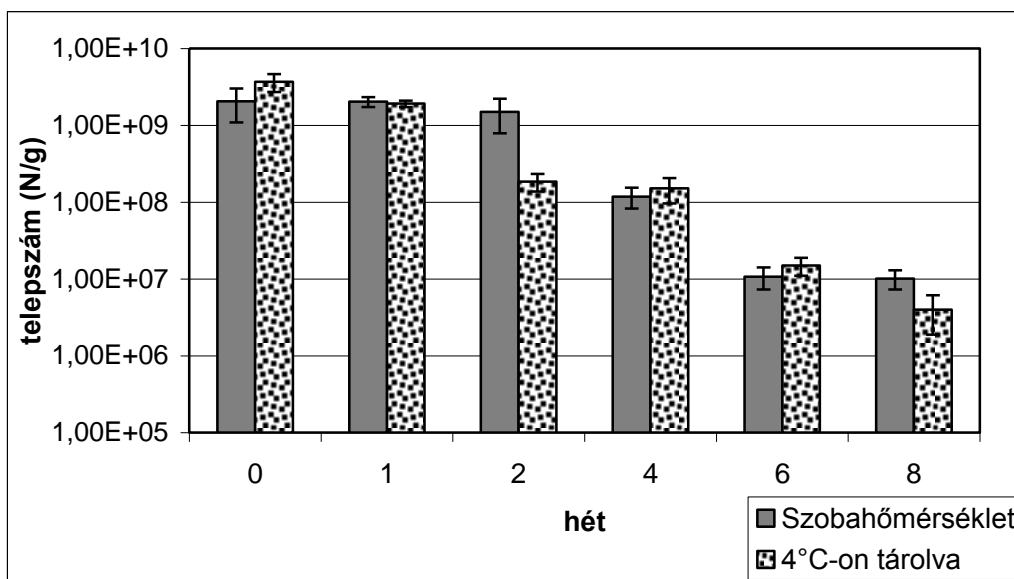
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>	Összesen
<b>Szükséges induló sejtszám (TKE/g)</b>	$3,16 \times 10^5$	$3,58 \times 10^5$	$6,74 \times 10^5$
<b>Arány (%)</b>	<b>47</b>	<b>53</b>	<b>100</b>
<b>Arány <math>1 \times 10^5</math> TKE/g induló csíraszámra vetítve</b>	$4,68 \times 10^4$	$5,32 \times 10^4$	
<b>DVS kultúra csíraszám (TKE/g)</b>	$1,50 \times 10^8$	$3,60 \times 10^9$	
<b>Bemérendő mennyiség (g) 1 g fonnyasztott szilázshoz (<math>1 \times 10^5</math> TKE/g sejtkoncentrációjú inokulum)</b>	$3,12 \times 10^{-4}$	$1,48 \times 10^{-5}$	$3,27 \times 10^{-4}$
<b>Bemérés (g) 1 kg szilázshoz</b>	0,3123	0,0148	0,327
<b>Bemérés (g) 100 kg szilázshoz</b>	31,2264	1,4767	32,703
<b>Bemérés (g) 1 t szilázshoz</b>	312,2639	14,7668	327,031

Ásványi, B., Szücs, P., Szigeti, J. & Varga, L. (2008) Harmadik generációs biológiai tartósítószer tárolás alatti mikrobaszám-változásának vizsgálata. XXXII. Óvári Tudományos Nap "Élelmiszer-gazdaságunk kérdőjelei napjainkban – Dr. Dr. h. c. Iváncsics János (1938-2002) születésének 70. évfordulója tiszteletére". Az előadások és poszterek teljes terjedelemben megjelent anyagai. Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Mosonmagyaróvár, Compact Disc, 5 pp. [ISBN: 978-963-9883-05-5]

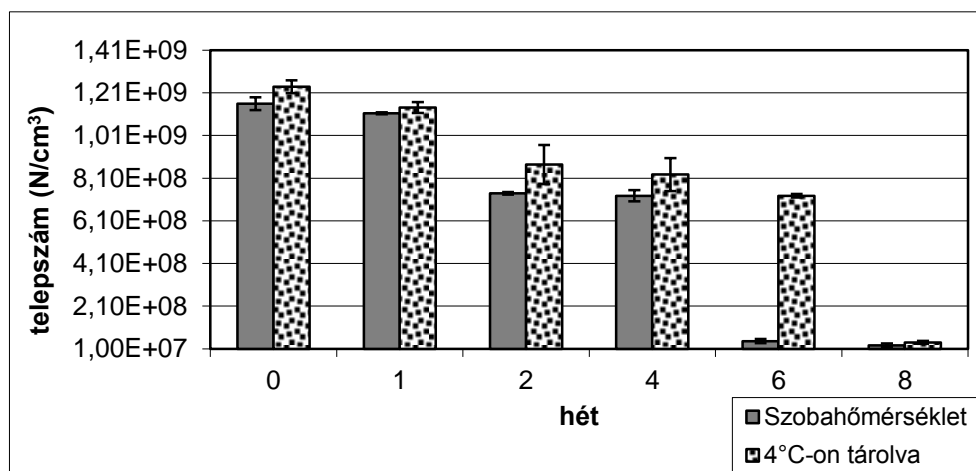
A liofilezett keverékkultúrák élősejt-számát előzetesen lemezöntéses-teleszámlálásos módszerrel ellenőriztük (*Lactobacillus plantarum*:  $1,5 \times 10^8/\text{cm}^3$ , *Lactobacillus buchneri*:  $3,6 \times 10^9/\text{cm}^3$ ). Az inokulum sejtszámának beállításakor figyelemmel voltunk az előírányzott min.  $1 \times 10^5$  TKE/g-os induló csíraszámra. A baktériumkeverék kialakításánál figyelembe vettük, hogy 100 szoros hígításban is elérjük a grammonkénti  $10^5$ -enes nagyságrendű tejsavtermelő baktériumszámot a szilázsban.

Tárolási kísérleteink során a keverékkultúrában szereplő liofilezett *Lactobacillus* fajok számának változását a szénhidrátforráshoz keverve külön vizsgáltuk, amelynem során.

A teleszámlálások során kapott eredményeket az idő függvényében ábrázoltuk. Az 1-2. ábrán a takarmány tartósítás szempontjából legfontosabb savtermelő mikrobák számát láthatjuk szobahőmérsékleten és 4°C-on tárolva liofilezett *Lactobacillus plantarum* illetve *Lactobacillus buchneri*-vel kevert hidrolizált kukoricadara esetében.



1. ábra A liofilezett *Lactobacillus plantarum*-mal kevert hidrolizált kukoricadara savtermelő mikroorganizmus számának alakulása a tárolás során



2. ábra A liofilezett *Lactobacillus buchneri*-vel kevert hidrolizált kukoricadara savtermelő mikroorganizmus számának változása a tárolás során

Ásványi, B., Szücs, P., Szigeti, J. & Varga, L. (2008) Harmadik generációs biológiai tartósítószer tárolás alatti mikrobaszám-változásának vizsgálata. XXXII. Óvári Tudományos Nap "Élelmiszer-gazdaságunk kérdőjelei napjainkban – Dr. Dr. h. c. Iváncsics János (1938-2002) születésének 70. évfordulója tiszteletére". Az előadások és poszterek teljes terjedelemben megjelent anyagai. Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszer-tudományi Kar, Mosonmagyaróvár, Compact Disc, 5 pp. [ISBN: 978-963-9883-05-5]

Az eredményekből látható, hogy a szobahőmérsékleten tárolt *Lactobacillus plantarum*-mal kevert hidrolizált kukoricadara esetében a savtermelő mikroorganizmusok száma a 8. héten ha kicsivel ugyan, de meghaladta a  $1 \times 10^7$  nagyságrendet (1. ábra), hűtött kezelés esetében azonban ez csak a 6. hétig mondható el. Mindez azt jelzi, hogy ez a tejsavbaktérium érzékenyebb az alacsony tárolási hőmérsékletre, amely más kísérletek alapján a hűtés hatására a citoplazmában bekövetkező változásokra vezethető vissza.

A 2. ábra alapján elmondható, hogy a liofilezett *Lactobacillus buchneri*-vel kevert hidrolizált kukoricadara esetében az előbb említett mikroorganizmusok száma mindkét tárolási forma esetében meghaladta a kívánatos nagyságrendet a 8. hét végéig.

A nem savtermelő mikrobaszám esetében mindkét kezelésnél hasonló tendenciát figyelhettünk meg: a 2. hétig számuk folyamatosan csökken, majd a további mintákban már nem találtunk kimutatható mennyiségben ezen mikroorganizmusokból. Számuk és így az erjedésben játszott szerepük a tejsavtermelő baktériumok elszaporodásával egyidejűleg csökkent.

Az élesztők száma mindkét mikroorganizmussal végzett kezelés során folyamatosan csökkent egészen a 6. hétig azonban ez a csökkenés kisebb mértékű volt, mint a nem savtermelők esetében, mivel ebben az esetben a kiindulási sejtszám grammonként 1000-es nagyságrendű, így az erjedésben játszott szerepük is minimális.

Penészek esetében fordított tendenciát figyelhettünk meg mindkét kezelés esetében. Számuk lassú emelkedést mutatott, amely a 8. hét végére elérte a grammonkénti  $10^2$  nagyságrendet, azonban szerepük még így is elhanyagolható. Tárolás alatti lassú szaporodásuk azzal magyarázható, hogy jól tűrik a szárazságot és alacsony vízaktivitási értékek mellett is életképesek

#### 4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Az eredmények alapján elmondható, hogy a *Lactobacillus plantarum*, ill. *Lactobacillus buchneri* liofilizált formáját és hidrolizált kukoricadarát tartalmazó keverék zárt csomagolásban szobahőmérsékleten 8. hétig eltartható úgy, hogy a silózandó alapanyaghoz 0,5-1,5%-ban adagolva az erjedés kezdetén biztosítja a kívánatos  $10^5$ /g savtermelő mikrobaszámot.

#### 5. IRODALOMJEGYZÉK

Driehuis, F. - Oude Elferink, W. J. W. H. – Spoelstra, S. F. (1999). Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. J. Appl. Microbiol. 87:583-594.

URL<sup>1</sup>:<http://medipharm.hu/index.php?oldal=tudomany&id=24>