

Nutztiere

Konservierungsmittel für Milchnebenprodukte im Vergleich

Adriana F. Spara, Andreas Gutzwiller, Jean-Louis Gafner und Peter Stoll, Eidgenössische Forschungsanstalt für Nutztiere, 1725 Posieux
Auskünfte: Andreas Gutzwiller, E-Mail: andreas.gutzwiller@rap.admin.ch, Tel. +41 (0)26 407 72 23, Fax +41 (0)26 407 73 00

Zusammenfassung

Mikroorganismen vermehren sich in Milchnebenprodukten rasch; deshalb müssen diese Flüssigfutter entweder rasch verfüttert oder mit einem Konservierungsmittel vor Verderb geschützt werden. Da von Landwirten häufig gefragt wird, welches Konservierungsmittel empfohlen werden könnte, verglichen wir in einer Untersuchung unter Laborbedingungen die Eignung von 0,2% Ameisensäure, 0,3% und 0,6% Propionsäure sowie von 0,05% Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zur Konservierung von Schotte (=Molke). Nach Beimpfen der Schotteproben mit natürlich kontaminierter Schotte und Zusatz der Konservierungsmittel wurden die Proben während vier Tagen inkubiert. Der Gasdruck in den Gefässen wurde kontinuierlich gemessen, und einmal pro Tag wurde die Hefekeimzahl bestimmt. In den mit Ameisensäure konservierten Proben wurden die tiefsten Hefekeimzahlen und die geringsten Druckabweichungen vom Nullpunkt gemessen ($P < 0,05$). In dieser Untersuchung war die Ameisensäure somit den anderen Konservierungsmitteln überlegen. Das H_2O_2 unterdrückte die Hefen während den ersten zwei Tagen stärker als die Propionsäure; seine keimhemmende Wirkung verschwand jedoch gegen Ende der Inkubationszeit, da das H_2O_2 wahrscheinlich nach zwei Tagen abgebaut war. Unter der Voraussetzung dass H_2O_2 bei Bedarf nachdosiert wird, dürfte es somit ein geeignetes Konservierungsmittel sein. Obwohl die Hefekeimzahl in den mit Propionsäure konservierten Proben nicht abnahm, kam es oft zu einem Unterdruck in den Gefässen, was ein Hinweis auf eine mikrobielle Aktivität mit Gasverbrauch ist. In mit Propionsäure konservierter Schotte kann deshalb der sogenannte PET-Flaschentest, in dem die Gasbildung als Indikator für den mikrobiologischen Verderb halbquantitativ bestimmt wird, unter Umständen ein falsch negatives Resultat liefern.

Flüssige Milchnebenprodukte sind ein optimaler Nährboden für Laktobakterien und Hefen. Flüssigfutter mit einem zu hohen Hefegehalt können beim Schwein und beim Kalb Verdauungsstörungen mit Blähungen und Durchfall verursachen. Wenn diese für Verderb anfälligen Futtermittel nicht innerhalb kurzer Zeit verwertet werden, müssen sie deshalb möglichst kühl in sauberen Behältern gela-

gert werden. In der Regel werden den gelagerten Milchnebenprodukten Konservierungsmittel zugesetzt, um die Vermehrung von Mikroorganismen zu hemmen.

In diesem Zusammenhang wird von Tierhaltern oft die Frage gestellt, ob sich die Propionsäure zur Konservierung von Milchnebenprodukten eigne. Aus der Literatur ist bekannt, dass Pro-

pionsäure vor allem gegen Schimmelpilze wirksam ist, während Ameisensäure die Hefen, nicht aber die Laktobakterien unterdrückt (Partanen und Mroz, 1999). Ameisensäure dürfte sich aufgrund dieser Angaben besser zur Vorbeuge gegen Hefevermehrung eignen. Da wir jedoch in der Literatur keine vergleichenden Angaben über die Wirksamkeit der beiden organischen Säuren zur Konservierung von Milchnebenprodukten fanden, verglichen wir im Labor die Wirkung der beiden organischen Säuren sowie von Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das ebenfalls häufig zur Konservierung von Milchnebenprodukten verwendet wird.

Gasbildung als Mass für die Mikrobentätigkeit

Da die Bestimmung der Keimzahlen arbeitsaufwändig ist, die Resultate erst nach mehreren Tagen vorliegen und die krankmachende Wirkung von verdorbenen Milchnebenprodukten zumindest teilweise auf der mikrobiellen Gasbildung beruht, wurde im Versuch geprüft, ob der Druckverlauf in einem geschlossenen Inkubationssystem (Abb. 1) ein zuverlässiger Indikator für die Hefekeimzahl ist. Deshalb wurde zusätzlich zu den Druckmessungen die Hefekeimzahl in den Schotteproben bestimmt.

Versuchsprotokoll und Auswertung der Daten

Frische Proben von Schotte (=Molke) wurden mit drei Kulturen aus drei verschiedenen,

natürlicherweise kontaminierten Milchnebenprodukten beimpft, wobei eine Hefekeimzahl von 10^5 KBE¹/ml Probe angestrebt wurde. Unmittelbar nach der Beimpfung erfolgte der einmalige Zusatz der Konservierungsmittel (reine Ameisensäure, reine Propionsäure beziehungsweise 35-prozentiges H₂O₂)². Die beimpften Schotteproben wurden bei Raumtemperatur (20 - 25°C) während vier Tagen in Erlenmeyerkolben, die in regelmäßigen Abständen mechanisch geschwenkt wurden, inkubiert (Abb. 1). Druckmessgeräte ALMEMO® registrierten in einstündigen Abständen den Gasdruck. Ein Sicherheitsventil liess überschüssiges Gas entweichen, wenn der Druck im System 150 mbar überschritt. Die Inkubation und Druckmessung erfolgte für jede Schotteprobe im Doppel. In parallel beimpften und inkubierten Proben ohne Druckmessvorrichtung wurden alle 24 Stunden Proben zur Be-

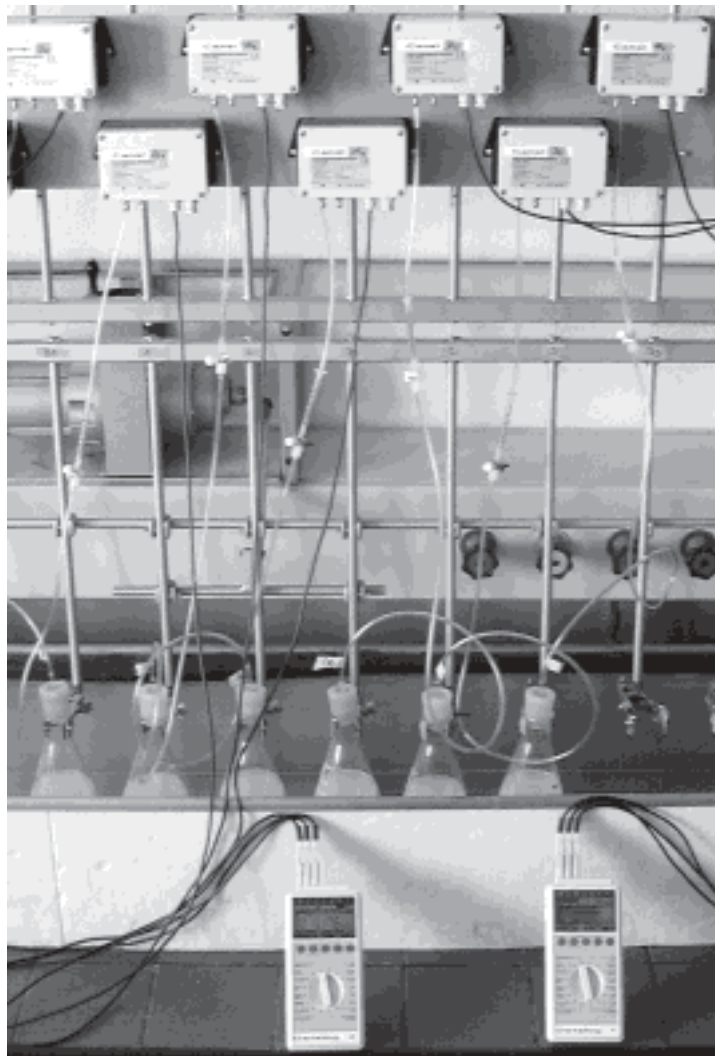


Abb. 1. Die kontaminierte Schotte wurde während vier Tagen bei Raumtemperatur inkubiert. Der Gasdruck im geschlossenen System wurde alle Stunden automatisch registriert.

¹ KBE= koloniebildende Einheiten; entspricht ungefähr der Zahl an vermehrungsfähigen Keimen.

² Aus versuchstechnischen Gründen (Druckverlaufmessung) war es nicht möglich, im Verlauf der Untersuchungen die Glasbehälter zu öffnen und H₂O₂ nachzudosieren. Unter Praxisverhältnissen wird der H₂O₂-Gehalt im Flüssigprodukt mittels Teststreifen gemessen und bei Bedarf H₂O₂ nachdosiert.

stimmung des pH-Wertes und der Hefekonzentration entnommen. Das Versuchsprotokoll ist schematisch in Tabelle 1 dargestellt.

Da mikrobielle Aktivität nicht nur mit Gasbildung, sondern auch mit Gasverbrauch einhergehen kann (FOSCHINO *et al.*, 1993), wurden die Druckabwei-

Tab. 1. Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung

Konservierungsverfahren	NK	AS	PS 0,3%	PS 0,6%	H ₂ O ₂
Konzentration des Konservierungsmittels ¹	-	0,2 %	0,3 %	0,6 %	0,05 % ²
Anzahl Gefässe zur Druckmessung	2	2	2	2	2
Anzahl Gefässe für pH, Hefezählung	1	1	1	1	1
Anzahl 4-tägige Untersuchungen					
Mikrobenkultur 1	2	2	2	1	2
Mikrobenkultur 2	2	2	2	2	2
Mikrobenkultur 3	2	2	2	2	2

NK = Negativkontrolle ohne Konservierungsmittel; AS = Ameisensäure; PS = Propionsäure; H₂O₂ = Wasserstoffperoxid

¹ einmaliger Zusatz zu Beginn der Inkubation; Konzentration der Reinsubstanzen in den Proben

² entspricht etwa 1.5 Liter H₂O₂ 35 % (technisch) pro Tonne Schotte

chungen sowohl in positiver (Überdruck) als auch in negativer Richtung (Unterdruck) als Zeichen einer unerwünschten mikrobiellen Aktivität gewertet. Beim statistischen Vergleich der Resultate wurde dies berücksichtigt, indem mit den Absolutbeträgen der Druckwerte gerechnet wurde.

Unterschiedlicher pH-Verlauf

Der pH-Verlauf ist in der Abbildung 2 dargestellt.

Der pH-Wert der frisch inkubierten Schotte betrug rund 5.5 und sank in der Negativkontrolle ohne Konservierungsmittel in den folgenden vier Tagen kontinuierlich auf knapp unter 4 ab. Der Zusatz von Ameisensäure senkte den pH sofort auf Werte zwischen 3 und 4. Die Propionsäure bewirkte in beiden Dosierungen eine sofortige pH-Senkung auf rund 4; anschliessend sank der pH langsam weiter auf Werte knapp unter 4. Nach der Zugabe von H_2O_2 blieb der pH in den ersten 24 Stunden im Bereich des Anfangswertes, um

später auf Werte bis um pH 4.5 zu sinken.

Während der pH-Abfall unmittelbar nach Zugabe der organischen Säuren eine direkte Wirkung der Säuren ist, sind die pH-Absenkungen im Verlauf der Inkubation ein Hinweis auf eine Vermehrung von Laktobakterien, die mit Milchsäurebildung einhergeht.

Der statistische Vergleich der pH-Werte zeigt, dass die mit Ameisensäure versetzten Proben einen signifikant tieferen pH als die übrigen Proben hatten ($P < 0.05$).

Ameisensäure hemmt Hefen am effizientesten

Die Abbildung 3 zeigt, dass die Hefekeimzahl zu Beginn der Inkubation in den Proben ohne Konservierungsmittel im Bereich 10^5 - 10^6 KBE/ml lag. Der Zusatz von Ameisensäure bewirkte eine sofortige und permanente Reduktion der Keimzahl auf Werte unter 10^3 KBE/ml. Das H_2O_2 bewirkte eine sofortige 10-fache Reduktion der

Hefekonzentration und verhinderte deren Vermehrung während den ersten 24 Stunden. Anschliessend stieg die Hefekonzentration kontinuierlich an und war nach vier Tagen gleich hoch wie in der Negativkontrolle. Die Propionsäure schien die Hefevermehrung zu bremsen, ohne sie jedoch effizient abzutöten, so dass die Hefenpopulation auf dem Ausgangsniveau blieb.

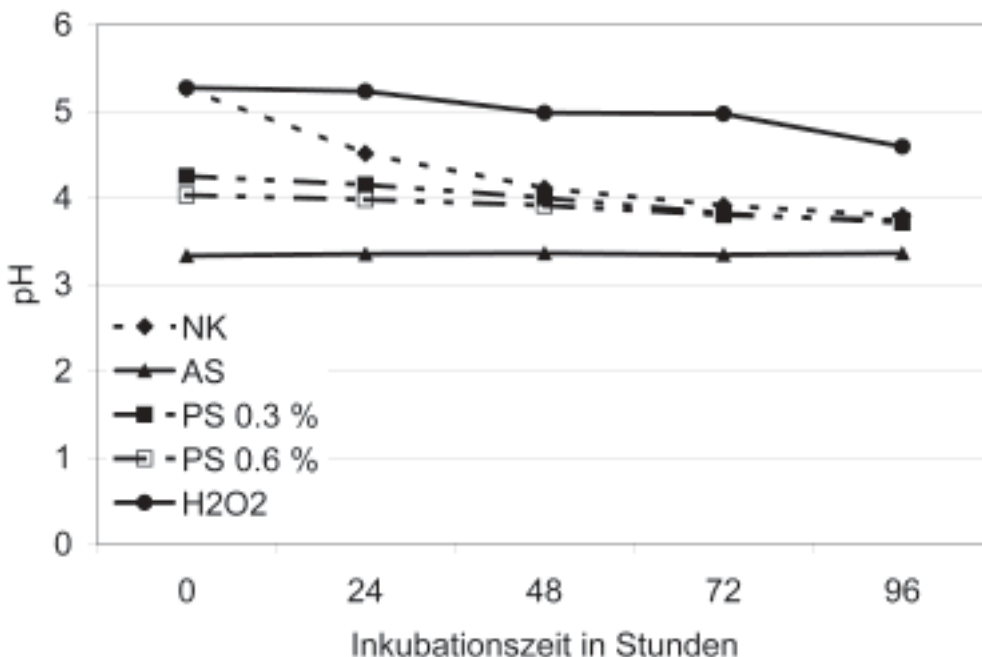
Der statistische Vergleich der Verfahren zeigt, dass die Ameisensäure die Hefekonzentration signifikant stärker unterdrückte als alle anderen Konservierungsmittel ($P < 0.05$). Die Propionsäure war dagegen in beiden Konzentrationen lediglich der Negativkontrolle tendenzmässig überlegen.

Geringste Druckschwankungen bei Zusatz von Ameisensäure

In der Abbildung 4 sind die Druckverlaufskurven der inkubierten Proben dargestellt.

Nach dem Zusatz von Ameisensäure traten signifikant geringere Druckabweichungen vom Nullpunkt als in sämtlichen übrigen Verfahren auf ($P < 0.05$). Die Propionsäure bewirkte in der tiefen Konzentration einen temporären und in der höheren Konzentration einen permanenten Druckabfall, was auf eine prinzipiell unerwünschte mikrobielle Aktivität mit Verbrauch von Sauerstoff und eventuell auch von CO_2 hinweist. Der Druck in den mit H_2O_2 konservierten Proben blieb während den ersten 24–48 Stunden sehr stabil und stieg anschliessend auf gleich hohe Werte wie in den Proben ohne Zusatz an; dies dürfte darauf zurückzuführen sein, dass das zu Beginn zugegebene H_2O_2 nach spätestens zwei Tagen abgebaut war und sich die Mikroorganismen anschliessend ungehindert vermehren konnten.

Abb. 2. pH-Verlauf in den inkubierten Schotteproben. In Schotteproben, die nicht für zur Gasdruckmessung dienten, wurde alle 24 Stunden der pH mit einer pH-selektiven Glaselektrode gemessen.



Druckmesswerte als Indikator für Keimbelastung

Die Resultate der Druckmessungen und der Hefe-Keimzahlbestimmungen zeigen, dass bei einmaliger Dosierung die Ameisensäure den beiden anderen geprüften Konservierungsmitteln überlegen ist. Die Druckabweichungen vom Nullpunkt geben somit einen Hinweis auf die mikrobielle Aktivität und das Prüfsystem mit den Druckmessungen kann verwendet werden, um grobe Anhaltspunkte über die mikrobielle Aktivität in flüssigen Milchnebenprodukten zu erhalten. Im Falle einer Kontamination mit einer reinen Hefekultur ist die Stoffwechselaktivität eng mit der Bildung von CO₂ korreliert (Ferreira *et al.*, 1997). Unsere Untersuchung mit natürlicherweise kontaminierter Schotte zeigt jedoch, dass es für die genaue Beurteilung der Mikrobentätigkeit nötig ist, sowohl die Gasbildung (Druckerhöhung) als auch den Gasverbrauch (Entstehung von Unterdruck) zu berücksichtigen. Es ist bekannt, dass mikrobieller Verderb durchaus auch mit Gasverbrauch, das heisst mit Bildung von Unterdruck verbunden sein kann (Foschini *et al.*, 1993). Falls wir in unserer Untersuchung lediglich die Druckerhöhungen und nicht sämtliche Druckabweichungen vom Nullpunkt als Indikatoren einer mikrobiellen Aktivität verwendet hätten, wäre es uns nicht gelungen, anhand der Druckwerte einen Unterschied in der antimikrobiellen Wirkung zwischen der Ameisensäure und der Propionsäure nachzuweisen. Dieses Resultat zeigt auch, dass der in der Praxis häufig angewandte «PET-Flaschentest» (siehe Kasten) voraussichtlich auch falsch negative Resultate liefern kann, das heisst, dass trotz ausbleibender Blähung der Flasche beziehungsweise des darüber gestülpten Ballons ein mikrobieller Verderb stattfinden kann.

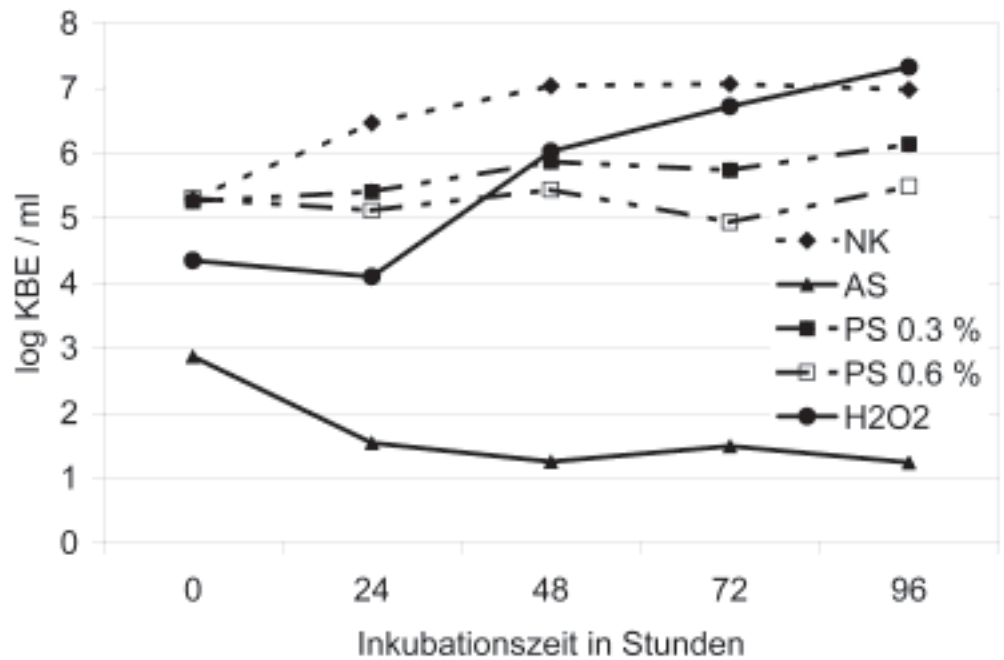


Abb. 3. Entwicklung der Hefekeimzahl in den inkubierten Schotteproben. In Schotteproben, die nicht für zur Gasdruckmessung dienten, wurde alle 24 Stunden die Hefekeimzahl bestimmt.

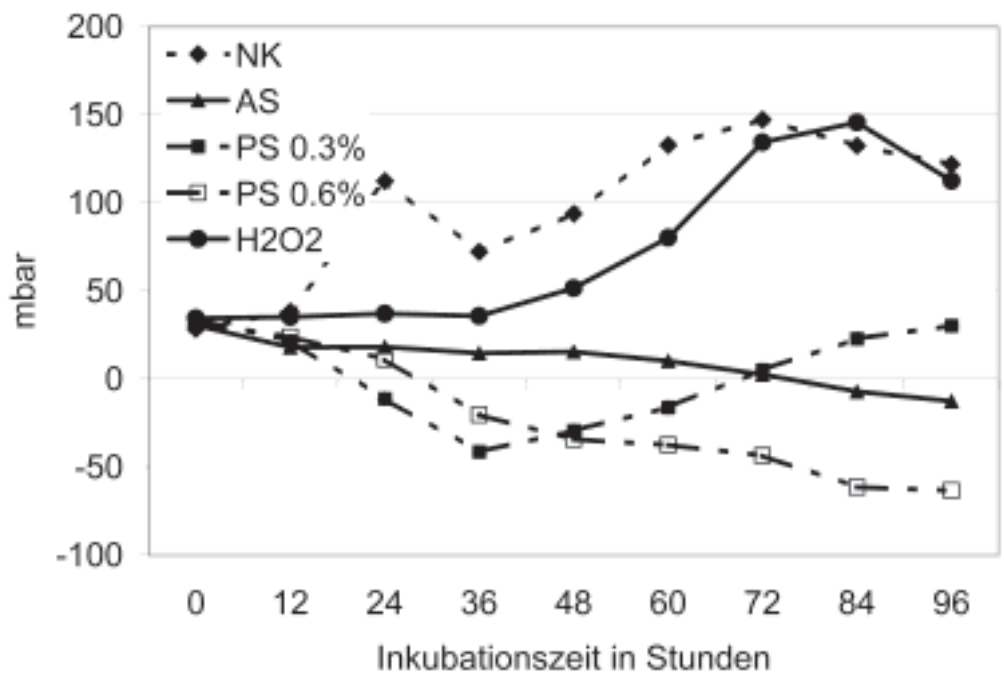


Abb. 4. Druckverlauf während der Inkubation der Schotteproben. Zum Schutz vor Überdruck im System konnte bei Druckwerten über 150 mbar Gas durch ein Ventil entweichen.

Abb. 5. PET-Flaschentest mit einem Flüssigfutter. Der Ballon ist durch eine leichte Gasbildung etwas aufgebläht.



Abb. 6. PET-Flaschentest. In dieser Flüssigfutterprobe wurde Gas (O_2 , CO_2) durch die Mikrobentätigkeit verbraucht. Durch den Unterdruck wurde der Ballon in die Flasche hineingezogen.



PET-Flaschentest

Unter Praxisbedingungen kann man die mikrobielle Gasbildung in Flüssigfutter einfach überprüfen, indem man eine saubere PET-Flasche mit dem Flüssigfutter füllt und einen Ballon über die Öffnung stülpt. Eine deutliche Gasbildung innerhalb von 12 bis 24 Stunden ist ein Hinweis auf eine starke Kontamination mit gasbildenden Keimen wie Hefen. In unserer Untersuchung ist jedoch manchmal das Phänomen aufgetreten, dass trotz hoher Hefezahl ein Unterdruck entstand. In diesem Fall dürften nicht nur Hefen, sondern auch Gas verbrauchende Keime aktiv gewesen sein.

Welches Konservierungsmittel zur Schottestabilisierung?

Bei einmaliger Dosierung war in unserer Untersuchung mit einer stark kontaminierten Schotte die Ameisensäure in 0,2-prozentiger Konzentration der Propionsäure (0,3 bzw. 0,6%) und dem H_2O_2 (0,05%) eindeutig überlegen. Es ist möglich, dass mit dem H_2O_2 ebenfalls eine gute Stabilisierung erreicht worden wäre, wenn der Peroxidgehalt der Schotte kontrolliert und bei Bedarf H_2O_2 nachdosiert worden

wäre, wie dies in der Praxis bei gelagerter Schotte geschieht. In der Untersuchung von Sollberger (1993), in der die Wirksamkeit von Ameisensäure, Zitronensäure und H_2O_2 zur Schottenkonservierung geprüft wurde, war die Ameisensäure in einer Konzentration von 0.02 % sehr wirksam, während die andere organische Säure die Keimzahl nicht reduzierte. In dieser Untersuchung war das H_2O_2 (0.03 – 0.05 %) während der viertägigen Untersuchung ebenso effizient wie die Ameisensäure. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die ursprüngliche Hefebelastung der von Sollberger (1993) geprüften Schotte (10^3 KBE/ml) viel geringer als die

Hefebelastung unserer Schotte (10^5 KBE/ml) war und deshalb das H_2O_2 weniger schnell abgebaut wurde. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Ameisensäure bei einmaliger Dosierung sicher wirkt, während die Wirksamkeit von H_2O_2 vom ursprünglichen Kontaminationsniveau des Flüssigfutters sowie von der korrekten Nachdosierung abhängen dürfte.

Literatur

■ Ferreira M., Loureiro-Dias M. and Loureiro V., 1997. Weak acid inhibition of fermentation by *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microb.* **36**, 145-153.

■ Foschino R., Garzaroli C. and Ottogalli G., 1993. Microbial contaminants cause swelling and inward collapse of yogurt packs. *Lait* **73**, 395-400.

■ Partanen K. and Mroz Z., 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutr. Res. Rev.* **12**, 117-145.

■ Sollberger H., 1993. Prüfung verschiedener chemischer Substanzen zur Schottenkonservierung. Interne Arbeitsunterlage FAM, Liebefeld.

RÉSUMÉ

Comparaison d'agents conservateurs pour les sous-produits laitiers

L'efficacité de 0.2% d'acide formique, de 0.3% et 0.6% d'acide propionique ainsi que de 0.05% de H_2O_2 comme agents conservateurs de petit-lait a été étudiée au laboratoire. Après inoculation avec des cultures provenant de petit-lait naturellement contaminé et adjonction des agents conservateurs, les échantillons ont été incubés pendant 4 jours. La pression de gaz dans les récipients a été enregistrée en continu et le nombre des levures a été déterminé chaque jour. Dans les échantillons contenant l'acide formique, le nombre de levures était le plus faible et les fluctuations de pression étaient les moins marquées ($P < 0.05$). Ainsi l'acide formique s'est avéré comme étant l'agent conservateur le plus efficace. Le H_2O_2 a inhibé les levures de manière plus efficace que l'acide propionique durant les deux premiers jours mais – probablement suite à sa dégradation - perdait ensuite son effet conservateur. Le H_2O_2 est probablement un agent conservateur efficace à condition d'être rajouté durant le stockage si nécessaire. Malgré le fait que le nombre de levures n'ait pas diminué dans les échantillons contenant l'acide propionique, la pression est souvent descendue en dessous de 0, suite à une utilisation de gaz par des microorganismes. Ceci démontre que des tests simples pour déterminer la formation de gaz comme indicateur de la détérioration microbiologique peuvent donner des résultats faux négatifs en présence d'acide propionique comme agent conservateur.

SUMMARY

Efficacy of whey preservatives

The efficacy of 0.2 % formic acid, 0.3% and 0.6% propionic acid and 0.05 % H_2O_2 against yeast growth in whey was tested in the laboratory. After inoculation with cultures of naturally contaminated whey and the addition of the preservatives the whey samples were incubated during four days. Gas pressure was measured continuously. Yeast numbers were counted once a day. The samples containing formic acid had the lowest yeast count and the smallest fluctuations in pressure ($P < 0.05$). Thus formic acid proved to be the most efficient whey preservative. H_2O_2 suppressed yeasts more efficiently than did propionic acid during the first two days but had no lasting effect, presumably because H_2O_2 had been used up. Although the yeast count was not reduced in the samples containing propionic acid gas pressure frequently decreased below 0, indicating that gas was used by microbes. Simple on farm tests, which measure gas formation semiquantitatively as an indicator for the presence of yeasts may therefore yield false negative results when propionic acid is used as a preservative.

Key words: whey, yeast, preservation, formic acid, propionic acid, hydrogen peroxide